

**Isolierung und funktionelle Charakterisierung
Histon-ähnlicher Proteine aus *Pseudomonas putida*:
in vitro-Untersuchungen zur Rolle von HU und IHF bei
der Aktivierung σ^{54} -abhängiger Promotoren des
TOL-Plasmids**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

Dissertation

von Frank Bartels

aus Wolfsburg

1. Referent:	Prof. Dr. Kenneth N. Timmis
2. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Wehland
eingereicht am:	03.08.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am:	26.01.2001
Druckjahr:	2001

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin oder den Mentor/die Betreuerin oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Bartels, F., Holtel, A., Oppenheim, A.B., Timmis, K.N. & de Lorenzo, V.: Establishment of an *in vitro* transcription system consisting of *Pseudomonas putida* components to study the activation of σ^{54} -dependent promoters in catabolic operons. (Poster) EMBO Workshop "Nucleoid-Associated Proteins", Camerino, Italien (1997).

Bartels, F., Holtel, A., Timmis, K.N., Oppenheim, A.B. & de Lorenzo, V.: Establishment of an *in vitro* transcription system consisting of *Pseudomonas putida* components to study the activation of σ^{54} -dependent promoters of catabolic operons. (Poster) Pseudomonas '97, VI International Congress on *Pseudomonas*, Madrid, Spanien (1997).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Mikrobieller Abbau von Schadstoffen	1
1.2 Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe durch Pseudomonaden	2
1.3 Abbau von Toluol durch <i>Pseudomonas putida</i> (pWW0)	3
1.3.1 Biochemie des Toluol-Abbaus	5
1.3.2 Regulation katabolischer <i>xyl</i> -Gen-Operons des <i>P. putida</i> TOL-Plasmids pWW0	5
1.3.2.1 Der <i>meta</i> -Loop	7
1.3.2.2 Die Regulationskaskade	7
1.3.2.3 Übergeordnete Regulationsmechanismen	7
1.3.2.4 Struktur der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1	8
1.3.2.5 Das XylR-Regulatorprotein	8
1.3.2.6 Modell der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1	9
1.4 Histon-ähnliche Proteine in Eubakterien	12
1.5 Rolle der Histon-ähnlichen Proteine IHF und HU in der Expression katabolischer <i>xyl</i> -Operons in <i>Pseudomonas putida</i> : Ziel dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1 Geräte	18
2.2 Verwendete Chemikalien	19
2.3 Nährmedien, Puffer, Lösungen und Enzyme	19
2.3.1 Vollmedien für Bakterien	19
2.3.2 Minimalmedium für Pseudomonaden	20
2.3.3 Antibiotika und sonstige Medienzusätze	21
2.3.4 Puffer	22
2.3.5 Enzyme	22
2.4 Bakterienstämme und Plasmide	22
2.5 Stammhaltung und Zellanzucht	25
2.6 Messung der Bakterienzellichte	25
2.7 Molekularbiologische Standardtechniken zur DNA-Isolierung und -Modifizierung	26
2.7.1 Schnelles Screening zur Analyse rekombinanter Plasmide	26
2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	26
2.7.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus Bakterienzellen	26
2.7.4 Reinigung von DNA-Lösungen durch Phenol-Chloroform-Extraktion	26
2.7.5 Ethanolfällung von DNA	27

2.7.6	Agarosegelelektrophorese	27
2.7.7	Extraktion von DNA-Banden aus einem Agarosegel.....	28
2.7.8	Enzymatische Manipulationen von DNA.....	28
2.7.8.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	28
2.7.8.2	Auffüllen überhängender 5'-Enden durch das Klenow-Fragment.....	29
2.7.8.3	Phosphatasebehandlung von Vektor-DNA	29
2.7.8.4	Ligation	29
2.8	Transformation von Bakterienzellen.....	30
2.8.1	CaCl ₂ -Methode	30
2.8.2	Elektroporation	30
2.8.3	Konjugativer Transfer von Plasmiden (Mating).....	31
2.9	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen	32
2.10	PCR	32
2.11	DNA-DNA-Hybridisierung.....	34
2.11.1	Herstellung Digoxigenin-markierter Gensonden mittels PCR	35
2.11.2	Southern-Blotting	36
2.11.3	Sondenhybridisierung	36
2.11.4	Immunologische Detektion von markierten DNA-Sonden	37
2.12	DNA-Sequenzierung	37
2.12.1	Dye-Terminator Cycle Sequencing mittels PCR.....	38
2.12.2	Aufbereitung der Reaktionsansätze für die Sequenzierung.....	38
2.12.3	Auswertung der Sequenzdaten	38
2.13	Proteinaufreinigung.....	39
2.13.1	Anzucht und Aufarbeitung der Zellen für die Säulenchromatographie	39
2.13.1.1	Protokoll für HupB, HupN und IHF.....	39
2.13.1.2	Protokoll für σ^{54}	40
2.13.1.3	Protokoll für RNA-Polymerase (Core-Enzym).....	41
2.13.2	Chromatographische Methoden zur Proteinaufreinigung	42
2.13.2.1	Heparin-Affinitätschromatographie	42
2.13.2.2	Ionenaustauscher-Chromatographie.....	43
2.13.3	Konzentrierung und Lagerung von Proteinen	43
2.13.4	Bestimmung von Proteingehalten.....	44
2.13.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
2.13.6	Western Blot für die N-terminale Protein-Sequenzierung	46
2.14	Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein- und Protein-DNA- Wechselwirkungen.....	46
2.14.1	Cross-Linking.....	46
2.14.2	β -Protein-abhängige Rekombination <i>in vitro</i>	47
2.14.3	Gel-Retentionsanalyse	48
2.15	Methoden zur Untersuchung der Aktivierung von Promotoren sowie ihrer Transkriptionsaktivität	48
2.15.1	β -Galactosidase-Test	48
2.15.2	<i>In vitro</i> -Transkription	49
2.16	Datenverarbeitung.....	51

3. Experimente und Ergebnisse	52
3.1 Klonierung und Charakterisierung zweier HU-Proteine codierender Gene von <i>P. putida</i> KT2442	52
3.1.1 Identifizierung, Isolierung und Klonierung von <i>hupB</i>	52
3.1.2 Identifizierung von <i>hupN</i> aus <i>P. putida</i> KT2442	57
3.1.3 Identifizierung eines zu <i>hupN</i> homologen Gens in <i>P. aeruginosa</i>	58
3.1.4 Phylogenetische Beziehungen zwischen HU-Proteinen	61
3.1.5 Aufreinigung nativen HU-Proteins aus <i>P. putida</i> KT2442	61
3.1.6 Untersuchung der Aktivität des nativen HU-Proteins	63
3.1.7 Komplementation einer <i>Bacillus subtilis</i> <i>hbs</i> -Mutante durch <i>hupB</i> und <i>hupN</i>	64
3.1.8 Konstruktion von <i>hupB</i> - und <i>hupN</i> -Deletionsmutanten in <i>P. putida</i> KT2442 zur Untersuchung des Einflusses von HupB und HupN auf die Aktivierung des Ps1-Promotors	66
3.1.8.1 Konstruktion eines Ps::lacZ-Reporterstammes von <i>P. putida</i> KT2442	66
3.1.8.2 Konstruktion von <i>hupB</i> - und <i>hupN</i> -Deletionsmutanten von <i>P. putida</i> KT2442	68
3.1.8.3 Eine <i>hupB/hupN</i> -Doppelmutante scheint nicht lebensfähig zu sein	71
3.1.8.4 Effekt der <i>hupB</i> - bzw. <i>hupN</i> -Deletion auf die Ps1-Promotoraktivität in <i>P. putida</i> KT2442	73
3.2 Aufreinigung und Charakterisierung von HupB und HupN	74
3.2.1 Konstruktion von <i>P. putida</i> -Stämmen zur Überexpression von <i>hupB</i> und <i>hupN</i>	75
3.2.2 Aufreinigung von HupB und HupN	76
3.2.3 Cross-Linking von HupB und HupN	78
3.2.4 Die Aktivität von HupB und HupN in <i>in vitro</i> -Rekombinationstests	80
3.3 Überexpression, Aufreinigung und Charakterisierung von IHF aus <i>P. putida</i> KT2442	81
3.3.1 Konstruktion eines IHF-Expressionsplasmids	82
3.3.2 Aufreinigung von IHF aus <i>P. putida</i> KT2442	85
3.3.3 Aktivität von IHF in <i>in vitro</i> -Rekombinationstests	87
3.3.4 Untersuchung der Bindung von <i>P. putida</i> -IHF im Pu-Promotor	88
3.4 Überexpression und Aufreinigung von σ^{54} aus <i>P. putida</i>	90
3.5 Aufreinigung von nativer RNA-Polymerase (Core-Enzym) aus <i>P. putida</i> KT2442	93
3.6 <i>In vitro</i> -Untersuchung der Transkriptionsaktivität der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 mit aufgereinigten Proteinen aus <i>P. putida</i>	96
3.6.1 Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen und Konzentrationen der Komponenten	97
3.6.2 Einfluß von HupB, HupN und IHF auf die Transkriptionsaktivität von Ps1	98
3.6.3 Einfluß von HupB, HupN und IHF auf die Transkriptionsaktivität von Pu	102
3.6.4 Einfluß der Temperatur auf die Aktivierung von Pu und Ps1	104
4. Diskussion	106
4.1 <i>In vitro</i> -Transkriptionssystem exklusiv mit <i>P. putida</i> -Komponenten	106
4.2 HU aus <i>P. putida</i>	108

4.3	IHF aus <i>P. putida</i>	113
4.4	σ^{54} -RNA-Polymerase aus <i>P. putida</i>	115
4.5	Analyse der Pu- und Ps1-Promotoraktivitäten in <i>in vitro</i> -Transkriptionsversuchen mit Proteinkomponenten aus <i>P. putida</i>	117
4.5.1	Die Promotoren Pu und Ps1 können jeweils durch HupB oder HupN aktiviert werden	117
4.5.2	<i>In vitro</i> wird Ps1 durch IHF nicht reprimiert.....	118
4.5.3	HupB und HupN bilden wahrscheinlich HupB/HupN-Heterodimere in <i>P. putida</i>	120
4.5.4	IHF und HU sind möglicherweise an der Aktivierung von Pu beteiligt	121
4.5.5	Pu wird <i>in vivo</i> wahrscheinlich von weiteren Faktoren außer IHF und HU reguliert.....	123
4.5.6	Bei tieferen Temperaturen sinkt die Ps1-Aktivität drastisch ab	123
5.	Zusammenfassung	127
6.	Abkürzungen	129
5.	Literaturverzeichnis	131
	Danksagung	143
	Lebenslauf	144

1. Einleitung

1.1 Mikrobieller Abbau von Schadstoffen

Durch die industrielle Tätigkeit des Menschen wurden besonders in den letzten Jahrzehnten große Mengen an umweltbelastenden Chemikalien freigesetzt. Viele dieser Chemikalien haben strukturelle Ähnlichkeiten zu natürlich vorkommenden Verbindungen und werden deshalb von Mikroorganismen abgebaut. Sogenannte Xenobiotika dagegen, d.h. Chemikalien, die in der Natur nicht vorkommen, werden schlecht oder überhaupt nicht abgebaut. Sie akkumulieren daher in der Umwelt und stellen oft wegen ihrer Toxizität ein erhebliches Problem dar (Singleton, 1994). Der Grund für das Unvermögen der Mikroorganismen, diese Fremdstoffe vollständig zu CO₂ und H₂O zu mineralisieren, liegt darin, daß sich solche Xenobiotika noch nicht lange genug in der Biosphäre befinden, um den Mikroorganismen die Evolution geeigneter und optimierter Abbauewege ermöglicht zu haben (Van der Meer *et al.*, 1992). Beispiele für solche persistierenden, toxischen Xenobiotika sind halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe, die als Pestizide, Weichmacher oder als Isolier- und Hydraulikflüssigkeiten Verwendung finden bzw. fanden und in ganz unterschiedlichem Maße biologisch abbaubar sind. Die Art, Zahl und Position der Halogen-Substituenten am jeweiligen Kohlenstoffgerüst bestimmt dabei die Abbaubarkeit durch verschiedene Mikroorganismen (Gottschalk & Knackmuss, 1993).

Standorte, die mit leicht abbaubaren Verbindungen kontaminiert sind, werden bereits jetzt mit biologischen Verfahren saniert, die oft kostengünstiger und umweltverträglicher sind als entsprechende chemisch-physikalische Verfahren wie z.B. die vollständige Verbrennung (Linz *et al.*, 1991). Häufig genügt bereits eine Stimulierung der in der kontaminierten Zone selbst vorhandenen Mikroorganismen (*in situ*-Behandlung), um die Mineralisation der abzubauenen Substanzen zu erreichen (Bouwer *et al.*, 1994). Komplexe Schadstoffmischungen, die schlechte Bioverfügbarkeit der Zielchemikalie (Adsorption an Bodenpartikel), zu hohe oder für den mikrobiellen Abbau zu niedrige Schadstoffkonzentrationen, die Entstehung unerwünschter Metabolite oder auch das gänzliche Fehlen geeigneter Stämme bzw. Abbauewege schränken die Anwendbarkeit der biologischen Sanierung bisher jedoch noch erheblich ein (Pieper *et al.*, 1996).

Eine Möglichkeit, diese Schwierigkeiten zu umgehen, ist die genetische Optimierung von schadstoffabbauenden Bakterien (Timmis *et al.*, 1994). Hierbei werden Abbauewege in

geeigneter Weise kombiniert, vervollständigt und stabil in das Genom geeigneter Bakterien integriert. So kann durch entsprechendes Design solcher genetisch modifizierten Organismen ausreichende Synthese der den Schadstoffabbau vermittelnden Enzyme auch bei nur geringen Schadstoffkonzentrationen erreicht werden.

Detailliertes Wissen über die Regulation der entsprechenden Gene ist somit aber immer eine unverzichtbare Grundlage, um kontrollierte und koordinierte Expression der neukombinierten Abbaupfade in den Mikroorganismen sicherzustellen, die für biologische Sanierungszwecke eingesetzt werden sollen.

1.2 Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe durch Pseudomonaden

Bakterien, insbesondere der Gattung *Pseudomonas*, besitzen ein erhebliches Potential, natürlich vorkommende Kohlenwasserstoffe und aromatische Verbindungen, darunter eben auch z.B. chlorhaltige Verbindungen (Gottschalk & Knackmuss, 1993; Schlegel, 1992), abzubauen und als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle zu nutzen. Die für den Abbau verantwortlichen Gene sind häufig auf größeren Plasmiden oder auch auf dem Chromosom lokalisiert (z.B. Pemberton & Fisher, 1977; Furukawa & Miyazaki, 1986). Nicht selten stammen sie ursprünglich von Transposons ab, was, ebenso wie die Lokalisierung dieser Gene auf Plasmide, zur Verbreitung der Abbaugene in verschiedene Spezies beiträgt (horizontaler Gentransfer) (Reineke & Knackmuss, 1979).

Die für den Abbau von aromatischen Verbindungen verantwortlichen Gene sind meistens in größeren Operons organisiert. Beispiele hierfür sind die *xyl*-Gene auf dem TOL-Plasmid (pWW0) von *Pseudomonas putida* mt-2 für den Abbau von Toluol bzw. Xylol (Assinder & Williams, 1990), die *nah*-Gene auf dem NAH7-Plasmid von *P. putida* G7 für den Naphtalin-Abbau (Yen & Gunsalus, 1982), die chromosomalen *bph*-Gene von *P. pseudoalcaligenes* KF707 für den Abbau von Biphenyl (Taira *et al.*, 1992) und die *dmp*-Gene auf dem Plasmid pVI150 von *Pseudomonas* sp. CF600 für den Phenol-Abbau (Shingler *et al.*, 1992).

Der aerobe Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen durch Pseudomonaden erfolgt im allgemeinen in drei Schritten (Harayama & Timmis, 1992). Im ersten Schritt werden durch Mono- oder Dioxygenasen Hydroxylgruppen in den aromatischen Ring eingeführt, was zur Bildung von Catecholen führt. Im zweiten Schritt erfolgt eine Ringspaltung durch Dioxygenasen, wobei der aromatische Ring entweder intradiol (*ortho*) oder extradiol (*meta*) gespalten werden kann. Im dritten Schritt schließlich werden die Produkte der jeweiligen Ringspaltung in kleinere aliphatische Verbindungen überführt, die dann in den zentralen Stoffwechsel eingehen.

Um auf sich ändernde Umweltbedingungen, wie z.B. die Zusammensetzung und

Konzentration der Nährstoffe, angemessen reagieren und sich damit gegen die Konkurrenz anderer Mikroorganismen behaupten zu können, haben die *Pseudomonaden* (wie andere Bakterien auch) hocheffiziente, sehr spezifische und sensitive Regulationssysteme entwickelt.

1.3 Abbau von Toluol durch *Pseudomonas putida* (pWW0)

Der gut untersuchte Toluol/Xylol-Abbau durch *P. putida* (Worsey & Williams, 1975; Harayama *et al.*, 1987) stellt ein geeignetes Modellsystem dar, um spezifische regulatorische Fragestellungen näher zu untersuchen. Die für den Toluol/Xylol-Abbau verantwortlichen Gene sind auf dem sog. TOL-Plasmid pWW0 aus *P. putida* mt-2 lokalisiert, welches mit ca. 117 kb zu den größten bekannten Plasmiden gehört (Williams & Murray, 1974). Ungefähr 40 kb davon codieren für die Enzyme und Regulatorproteine des Toluol-Abbaus. Neben dem TOL-Plasmid pWW0 aus *P. putida* mt-2 wurden in weiteren *Pseudomonas*-Stämmen ähnliche TOL-Plasmide beschrieben, die wie pWW0 für den Abbau spezifischer Aromaten codieren und in der genetischen Organisation pWW0 weitgehend entsprechen (Williams & Worsey, 1976; Duggleby *et al.*, 1977).

Im Vergleich zur Regulation des Biphenyl-Abbauweges, welche noch relativ wenig untersucht worden ist (Williams & Sayers, 1994), wurde im Fall von *P. putida* seit 1975 (Worsey & Williams, 1975) das Wissen über die Regulation der *xyl*-Operons des TOL-Plasmids (pWW0) kontinuierlich erweitert. Somit gehört das *xyl*-System nunmehr nicht nur zu den am besten untersuchten Abbauwegen überhaupt, sondern es konnten hier auch generelle Fragestellungen zur Aktivierung und Repression verschiedener Promotoren unter Beteiligung interagierender Regulatorproteine und Effektoren untersucht werden, wobei die erhaltenen neuen Erkenntnisse detaillierten Einblick in Regulationsprozesse an Promotoren allgemein erlauben. Somit sind die *xyl*-Operons auch gut geeignet, neue Strategien zur Optimierung von Abbauwegen auszutesten, um z. B. sog. „Bottlenecks“ (limitierende Schritte) beim Abbau von Schadstoffen gezielt zu überwinden. Langsame Turnover-Raten, nur begrenzte Substratspektren der beteiligten Enzyme sowie spezifische Regulationsprobleme sind weitere bei verschiedenen Abbauwegen zu findende Barrieren, die oft einen effizienten Schadstoffabbau verhindern. Regulatorische Probleme können z.B. daraus resultieren, daß sehr hohe Substratkonzentrationen zur „Anschaltung“ der Abbaugene erforderlich sind, Regulatorproteine nur enge Effektorspektren besitzen, übergeordnete Regulationssysteme hemmend wirken oder sonstige Probleme bei der Expression von Abbauwegen in den verschiedenen Organismen vorliegen. Voraussetzung für die Optimierung der genannten Punkte ist, daß alle an der Regulation beteiligten Proteine bekannt sein müssen. Der hohe Kenntnisstand über die Regulation der *xyl*-Gene des TOL-Plasmids ist daher eine gute Basis für die Identifizierung weiterer beteiligter Proteine.

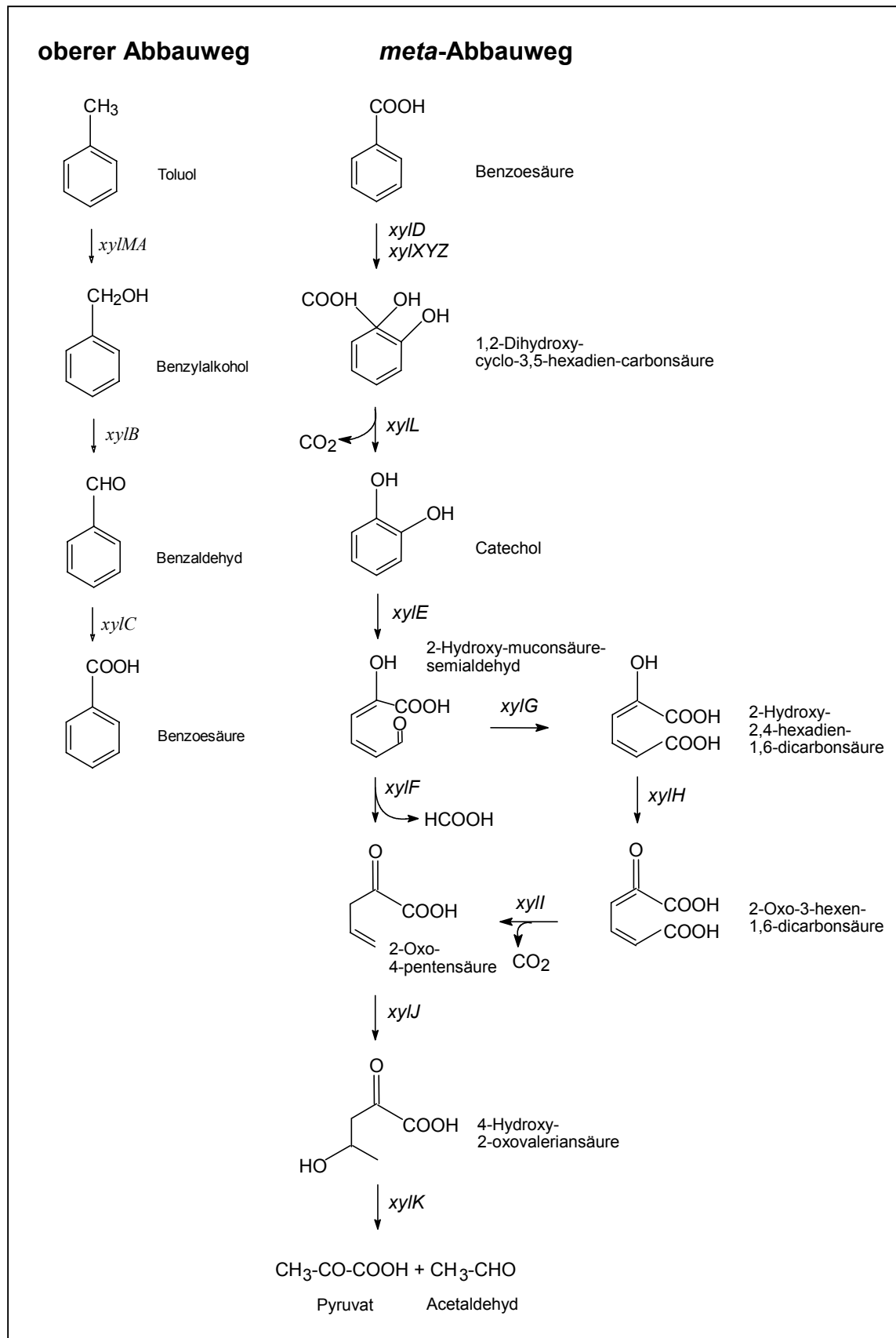


Abb. 1.1: Abbau von Toluol durch die auf dem TOL-Plasmid kodierten Enzyme. Die an der jeweiligen Reaktion beteiligten Enzyme sind durch die codierenden Gene dargestellt: *xylMA*: Toluol-

Oxygenase, *xylB*: Benzylalkohol-Dehydrogenase, *xylC*: Benzylaldehyd-Dehydrogenase, *xylDXYZ*: Benzoessäure-1,2-Dehydrogenase, *xylL*: Benzoessäure-Dihydrodiol-Dehydrogenase, *xylE*: Catechol-1,2-Dioxygenase, *xylF*: 2-Hydroxy-Muconsäuresemialdehyd-Aldolase, *xylG*: 2-Hydroxy-Muconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, *xylH*: 2-Hydroxy-2,4-hexadien-1,6-dicarbonsäure-Isomerase, *xylI*: 2-Oxo-3-hexen-1,6-dicarbonsäure-Decarboxylase, *xylJ*: 2-Oxo-4-pentensäure-Hydratase, *xylK*: 4-Hydroxy-2-oxovaleriansäure-Aldolase

1.3.1 Biochemie des Toluol-Abbaus

Der aerobe Abbau von Toluol kann, wie für *P. putida* F1 beschrieben (Zylstra & Gibson, 1989), entweder über die Hydroxylierung und anschließende Spaltung des aromatischen Rings erfolgen oder alternativ auch über die initiale Oxidation der Methylgruppe, wie dies im oberen Abbauweg bei *P. putida* (pWW0) der Fall ist.

In Abb. 1.1 ist der gesamte Toluol-Abbau bis zu den Metaboliten des Intermediärstoffwechsels durch die auf dem TOL-Plasmid codierten Enzyme dargestellt (Worsey & Williams, 1975). Außer Toluol können auch eine Reihe substituierter Derivate des Toluols mehr oder weniger effizient (je nach Substitution) als Substrate metabolisiert werden (Kunz & Chapman, 1981). Die Überführung des Toluols in Benzoessäure erfolgt in drei Schritten und wird als „oberer Abbauweg“ bezeichnet. Der sich anschließende Abbau von Benzoessäure zu Pyruvat und Acetaldehyd wird dann als „*meta*-Abbauweg“ bezeichnet, da nach der Umsetzung von Benzoessäure zu Catechol eine extradiolische (*meta*-) Ringspaltung durchgeführt wird. Im Anschluß erfolgt der weitere Abbau zu Pyruvat und Acetaldehyd, je nach Ausgangssubstrat über zwei alternative Reaktionswege (Harayama *et al.*, 1987).

Neben dem auf dem TOL-Plasmid lokalisierten *meta*-Abbauweg, bei dem Catechol extradiolisch (in *meta* Position) gespalten wird, gibt es in *P. putida* mt-2 (bzw. KT2442, einem Derivat von mt-2) einen weiteren Reaktionsweg zum Abbau von Catechol, der chromosomal codiert ist und der über eine intradiolische *ortho*-Spaltung verläuft („*ortho*-Abbauweg“) (Nakazawa & Yokota, 1973).

1.3.2 Regulation katabolischer *xyl*-Gen-Operons des *P. putida* TOL-Plasmids pWW0

Die *xyl*-Gene zum Abbau von Toluol liegen auf dem TOL-Plasmid pWW0 innerhalb eines 56 kb großen Transposons (Tn4651), welches wiederum Teil eines umfassenden 70 kb großen Transposons (Tn4653) ist (Tsuda *et al.*, 1989). Die Organisation der *xyl*-Gene entspricht der Biochemie des Toluol-Abbaus, so sind die Gene des oberen und des *meta*-Abbauwegs in zwei entsprechenden Operons angeordnet. Das für den oberen Abbauweg codierende Operon enthält die Gene *xylUWCMABN* (Harayama *et al.*, 1986, 1989; Williams *et al.*, 1996) und wird vom „upper pathway“-Promotor *Pu* transkribiert. Stromabwärts des oberen Operons befindet sich das für den *meta*-Abbauweg codierende Operon mit den Genen

xylXYZLTEGFJQKIH (Harayama & Rekik, 1990), welches eines der größten bekannten prokaryotischen Operons ist und dessen Expression durch den „*meta* pathway“-Promotor *Pm* reguliert wird. Beide Operons werden in gleicher Richtung transkribiert (Abb. 1.2). Die Gene für die beiden Regulatorproteine XylS und XylR liegen jenseits des 3'-Endes des *meta*-Operons und werden in entgegengesetzter Richtung transkribiert, wobei die jeweiligen zugehörigen Promotoren (*Ps* und *Pr*) teilweise überlappen.

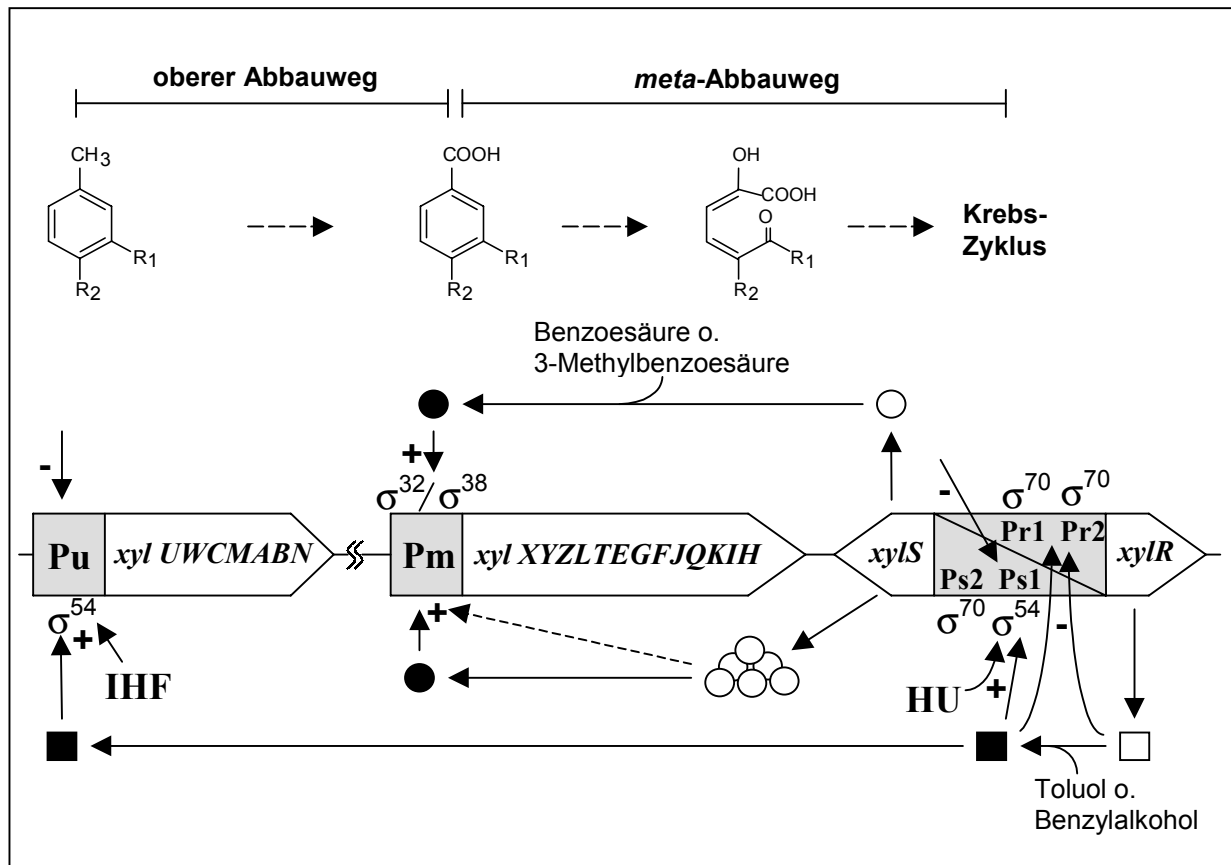


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Regulation der *xyl*-Gene des TOL-Plasmids pWW0. Oben abgebildet sind der obere und der *meta*-Abbaupfad, dessen Enzyme von den Genen der darunter dargestellten *xyl*-Operons codiert werden. An Promotoren (grau markiert) ist Repression durch „-“ und Aktivierung durch „+“ gekennzeichnet. Die Regulatorproteine XylR (□, ■) und XylS (○, ●) sind in der transkriptionsinaktiven Form als offene Symbole, in der transkriptionsaktiven Form als schwarze Symbole dargestellt.

Die Expression der beiden katabolischen Operons unterliegt zwei prinzipiellen Regelkreisen: der *meta*-Loop, welcher aktiv ist, wenn die Zellen mit Benzoat oder seinen Derivaten wachsen und einer Regulationskaskade („cascade loop“) bei Wachstum der Zellen auf Toluol bzw. Xylol, wobei dann oberer und *meta*-Abbaupfad koordiniert exprimiert werden (Ramos *et al.*, 1997) (Abb. 1.2). Darüber hinaus werden die *xyl*-Operons zudem von übergeordneten, globalen Regulationsmechanismen, wie z. B. der Katabolit-Repression, kontrolliert.

1.3.2.1 Der *meta*-Loop

Der *meta*-Loop wird in *P. putida* (pWW0) aktiviert, wenn Benzoat bzw. Alkylbenzoate dem umgebenden Medium zugesetzt werden. In Abwesenheit eines Benzoat-Effektors wird das *xylS*-Regulatorgen gering aber konstitutiv von einem σ^{70} -abhängigen Promotor (Ps2) aus transkribiert (Gallegos *et al.*, 1996). Bei Anwesenheit eines Benzoat-Effektors bindet dieser an XylS und aktiviert so das Regulatorprotein, welches in dieser Form die Transkription des *meta*-Operons vom Pm-Promotor stimuliert (Inouye *et al.*, 1981; Marqués *et al.*, 1994). XylS hat in der aktivierten Form eine höhere Affinität zu Pm und bindet diesen Promotor in der Region -40 bis -80 (Gallegos *et al.*, 1997a). Außerdem führt die Effektor-unabhängige Überexpression von *xylS* zur Transkription des *meta*-Operons, was auf ein Gleichgewicht zwischen aktivem und inaktivem XylS hindeutet (Spoonner *et al.*, 1987). Die typische Zusammensetzung aus Funktionsdomänen und vor allem das Vorhandensein von zwei HTH (helix-turn-helix)-Motiven in der konservierten DNA-bindenden Domäne identifizieren XylS als ein Mitglied der XylS/AraC-Regulatoren-Familie (Gallegos *et al.*, 1997b).

Der Pm-Promotor ist offenbar nicht vom allgemeinen Sigma-Faktor σ^{70} abhängig, da er zur Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase σ^{32} und in der stationären Phase σ^{38} benötigt (Marqués *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Die Regulationskaskade

Die Regulationskaskade wird angeschaltet, wenn ein Effektor (z. B. Toluol, Xylol oder Benzylalkohol) an das primäre Regulatorprotein, XylR, bindet und dieses so aktiviert. In der aktivierten Form vermittelt XylR nun die Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1, was zur Expression des oberen Abbauwegs und des *xylS*-Regulatorgens führt (Abb. 1.2). Die verstärkte Synthese des zweiten Regulatorproteins, XylS, nun bewirkt auch in Abwesenheit von Benzoat-Effektoren die Expression des *meta*-Abbauwegs. Sind dann Benzoate im Verlauf des Abbaus von Toluol/Xylol durch die Enzyme des oberen Abbauwegs gebildet worden, aktivieren sie XylS und leiten so auch auf diesem Wege die weitere Stimulierung der Transkription der Gene des *meta*-Operons ein. Diese koordinierte Expression des oberen und des *meta*-Abbauwegs ist notwendig, um die Akkumulation Zell-toxischer Metabolite des Toluol/Xylol-Abbaus zu vermeiden.

1.3.2.3 Übergeordnete Regulationsmechanismen

Die Expression der *xyl*-Gen-Operons unterliegt darüber hinaus auch noch übergeordneten, gesamt-zellulären Regulationsprinzipien (global regulation). Angriffspunkt dieser übergeordneten Regulationsmechanismen sind die σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1. Beispielsweise werden beide Promotoren trotz Anwesenheit von Effektoren reprimiert, wenn die Zellen mit maximalen Wachstumsraten wachsen (De Lorenzo *et al.*, 1993). Weiterhin

unterliegen Pu und Ps1 einer Katabolit-Repression, wobei in komplexen Medien oder in Minimalmedien mit z.B. Glucose als C-Quelle wiederum beide Promotoren reprimiert werden (Duetz *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1994; Marqués *et al.*, 1994). Obwohl im Effekt ähnlich, wird diese Katabolit-Repression in Pseudomonaden jedoch sicher nicht über den „klassischen“ cAMP-abhängigen Mechanismus wie in Enterobakterien vermittelt (Holtel *et al.*, 1994). Vielmehr scheinen globale Regulationssysteme beteiligt zu sein, die den Gesamt-Energiestatus der Zelle betreffen. Offenbar spielen in diesem Zusammenhang wohl auch Konzentration und Aktivität der Sigma-Faktoren eine Rolle, da durch Überexpression von σ^{54} die Repression des Pu-Promotors im Komplexmedium teilweise aufgehoben werden konnte (Cases *et al.*, 1996). Ein weiterer Faktor, der eine wichtige Rolle bei der C-Quellen-abhängigen Repression der σ^{54} -abhängigen Promotoren spielt, scheint das IIA^{Ntr}-Protein zu sein, das Ähnlichkeit zu Proteinkomponenten des Phosphoenolpyruvat: Glucose-Phosphotransferasesystem aufweist und dessen Gen (*ptsN*) in dem selben Cluster lokalisiert ist wie das σ^{54} -Gen (Du *et al.*, 1996; Cases *et al.*, 1999).

1.3.2.4 Struktur der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1

Das primäre Regulatorprotein XylR aktiviert in konzertierter Weise sowohl den σ^{54} -abhängigen Promotor Pu des oberen Abbauweges als auch den ebenfalls σ^{54} -abhängigen *xylS*-Promotor Ps1. Beide Promotoren besitzen drei homologe Regionen: die Bindungsstelle für die σ^{54} -RNA-Polymerase (σ^{54} -RNAP) bei -12/-24 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart, eine AT-reiche Region bei -40/-80 bp und die XylR-Bindungsstellen zwischen -120 und -190 bp. Die -12/-24-Regionen von Pu und Ps1 bestehen aus der Sequenz 5'-TGGCN₇TTGCTA-3', die typisch für σ^{54} -abhängige Promotoren ist und funktional der -10/-35-Region von σ^{70} -abhängigen Promotoren entspricht (Ramos *et al.*, 1987). Die AT-reiche Region in Pu enthält bei -55/-66 die Consensus-Sequenz für das IHF (integration host factor)-Protein (Holtel *et al.*, 1990; De Lorenzo *et al.*, 1991). IHF ist ein DNA-bindendes Protein, das an seiner Bindungsstelle einen Knick in der DNA induziert. In Ps1 scheint anstelle von IHF das DNA-bindende Protein HU in der entsprechenden Region zu binden, welches strukturelle Ähnlichkeit zu IHF hat, aber keine spezifische Bindungssequenz besitzt (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). Die XylR-Bindungsstellen in Pu und Ps1 werden als UAS (upstream activating sequences) bezeichnet und bestehen aus zwei invertierten Sequenzwiederholungen (inverted repeats) bei etwa -170 (UAS1) und -140 bp (UAS2). XylR bindet an die Consensus-Sequenz 5'-TTGATCAATTGATCAA-3', wobei die UASs sowohl in Pu als auch in Ps1 von dieser Sequenz leicht abweichen (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996d).

1.3.2.5 Das XylR-Regulatorprotein

Die Betrachtung von Struktur und Funktion des XylR-Regulatorproteins ist essentiell für das Verständnis der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 (s. u.). XylR gehört

zur Familie der NtrC/NifA-Regulatoren und besteht aus vier Domänen, denen jeweils verschiedene Funktionen zuzuordnen sind, nämlich DNA-Bindung, ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse bzw. Effektor-Bindung (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996b). Die Bindung eines Effektors an XylR löst wahrscheinlich eine Konformationsänderung des Proteins aus, die u. a. die DNA-Bindung verändert und gleichzeitig das Protein in die transkriptionsaktive Form überführt (Delgado *et al.*, 1995).

Die Expression des primären Regulatorgens *xylR* in der Regulationskaskade wird von zwei starken, σ^{70} -abhängigen Tandempromotoren (Pr1 und Pr2) kontrolliert, wobei XylR seine eigene Synthese durch Bindung in der Pr-Promotorregion negativ reguliert (Autoregulation) (Gomada *et al.*, 1992). Die Pr-Promotoren überlappen mit dem in entgegengesetzter Richtung orientierten σ^{54} -abhängigen *xylS*-Promotor (Ps1). Die für die Aktivierung des Ps1-Promotors erforderlichen XylR-Bindungsstellen (UAS) sind in den Bindungsregionen der σ^{70} -RNA-Polymerase im Pr-Promotor lokalisiert. Da auch nicht-aktiviertes XylR permanent an den UAS gebunden ist (Abril *et al.*, 1991), kommt es zu einer Repression des Pr-Tandempromotors ganz unabhängig von der Effektor-abhängigen Aktivierung des XylR-Proteins, die in der Aktivierung des Ps1-Promotors resultiert (Bertoni *et al.*, 1997).

Durch die Deletion der Effektor-bindenden A-Domäne von XylR (XylR Δ A) wurde ein mutiertes XylR-Regulatorprotein erhalten, das konstitutiv, also auch in Abwesenheit eines Effektors, die Transkription von Pu maximal stimulierte. Somit ist die A-Domäne als ein intramolekularer Repressor anzusehen, der die Aktivität von XylR steuert, indem durch Bindung eines Effektors an die A-Domäne die Repressorfunktion aufgehoben wird (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995b, 1996a, 1996c, 1996d). Diese Aktivierung über eine intramolekulare De-Reprimierung ist die Voraussetzung für die weiteren Prozesse, die schließlich zur transkriptionsaktiven Form von XylR führen.

Die intramolekulare Repressorfunktion der A-Domäne von XylR wird mechanistisch wahrscheinlich über eine Inhibition der ATP-Bindung bzw. der in der zentralen Domäne lokalisierten ATPase-Aktivität vermittelt. Zusammenfassend ergibt sich damit das folgende Modell der XylR-Aktivierung (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996a, 1996b): durch die Bindung eines Effektors an die A-Domäne von XylR, das an den UAS von Pu oder Ps1 gebunden ist, wird die intramolekulare Repression von XylR aufgehoben und ATP kann an der zentralen Domäne binden. Die hierdurch ausgelöste Konformationsänderung führt zur Oligomerisierung von XylR-Dimeren und bei Kontakt zur Promotor-gebundenen σ^{54} -RNA-Polymerase über Hydrolyse des an XylR gebundenen ATP zur Initiation der Transkription. Nach der ATP-Hydrolyse zerfällt das XylR-Oligomer wahrscheinlich wieder in Dimere.

1.3.2.6 Modell der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1

Typisch für σ^{54} -abhängige Promotoren ist, daß ein spezifisches Aktivator-Protein 100 bis 2000 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart an den sog. UAS (spezifischen

Erkennungssequenzen) bindet (Reitzer & Magasanik, 1986; Kustu *et al.*, 1991). An der -12/-24-Region gebundener σ^{54} -RNAP-Komplex ist zunächst (im Gegensatz zu σ^{70} -RNAP) transkriptionsinaktiv, und erst der Kontakt zwischen σ^{54} -RNAP und dem an den UAS gebundenen und aktivierten Regulator-Protein ermöglicht den Übergang vom geschlossenen in den offenen Promotor-Komplex bzw. die eigentliche Transkription (Gralla & Collado-Vides, 1996). Dieser Kontakt kann physisch nur zustande kommen, wenn die DNA im Bereich zwischen den UAS und der -12/-24-Region eine Schleife bzw. einen Knick ausbildet (Su *et al.*, 1990). Bei den meisten bisher untersuchten σ^{54} -abhängigen Promotoren befindet sich in dieser Region eine IHF-Bindungsstelle, wobei dann IHF absolut notwendig ist für die Aktivierung und Funktion dieser Promotoren, da dieses Protein dann an seiner Bindungsstelle den erforderlichen Knick in der DNA induziert (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1997b).

So bindet auch im Fall des Pu-Promotors IHF-Protein ca. 60 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart, und der durch die Bindung von IHF entstandene Knick in der DNA erlaubt dann den Kontakt zwischen dem an den UAS (-120 bis -190 bp) gebundenen XylR-Regulatorprotein mit der an der -12/-24-Region gebundenen σ^{54} -RNAP (De Lorenzo *et al.*, 1991). Die Funktion von IHF geht in Pu aber noch über die bloße Induktion und Stabilisierung eines Knicks in der DNA hinaus: die Bindung von IHF bewirkt zusätzlich eine stärkere Bindung (bzw. „Rekrutierung“) der RNAP an den Promotor, da es die C-terminale Domäne der α -Untereinheit (α -CTD) der RNAP in optimalen Kontakt zu einer spezifischen DNA-Region im Bereich -53 bis -114 bp (einem sog. UP-Element) bringt, so daß α -CTD leichter gebunden werden kann (Bertoni *et al.*, 1998; Carmona *et al.*, 1999). Möglicherweise kommt es zusätzlich zu Protein-Protein-Kontakten zwischen IHF und der α -CTD der RNAP, die die Bindung der σ^{54} -RNAP an den Promotor noch weiter verstärken (Bertoni *et al.*, 1998). IHF ist für die Funktion von Pu absolut notwendig, da in einer IHF⁻-Mutante von *P. putida* (dem natürlichen Wirtstamm des TOL-Plasmids) so gut wie keine Pu-Aktivität nachgewiesen werden kann (Calb *et al.*, 1996). Dagegen zeigt Pu in einer *E. coli*-IHF⁻-Mutante noch eine gewisse (Rest-)Aktivität, was man in diesem Stamm auf den Einfluß des mit IHF verwandten (und dieses vermutlich teilweise substituierenden) Proteins HU zurückführt (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a, 1997a). Bei *in vitro*-Transkriptions-Experimenten mit isolierten Proteinkomponenten aus *E. coli* sowie dem konstitutiven Aktivator XylR Δ A wurde in Abwesenheit von IHF bei Pu eine relativ hohe Grundaktivität festgestellt, woraus gefolgert wurde, daß weitere bisher nicht identifizierte Faktoren bei der Aktivierung von Pu eine Rolle spielen (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996a).

Der durch IHF induzierte Knick in der DNA ermöglicht jedenfalls in *P. putida in vivo* erst den Kontakt zwischen aktiviertem XylR und σ^{54} -RNAP, was wie ausgeführt die ATP-Hydrolyse am XylR-Protein und den Übergang der σ^{54} -RNAP am Promotor vom geschlossenen in den offenen Komplex zur Folge hat. Der derart aktivierte Pu-Promotor erlaubt dann die Transkription der Gene des oberen Abbauweges. Abb. 1.3 stellt die

räumliche Interaktion aller bisher bekannten, für die Aktivierung des Pu-Promotors notwendigen Elemente dar.

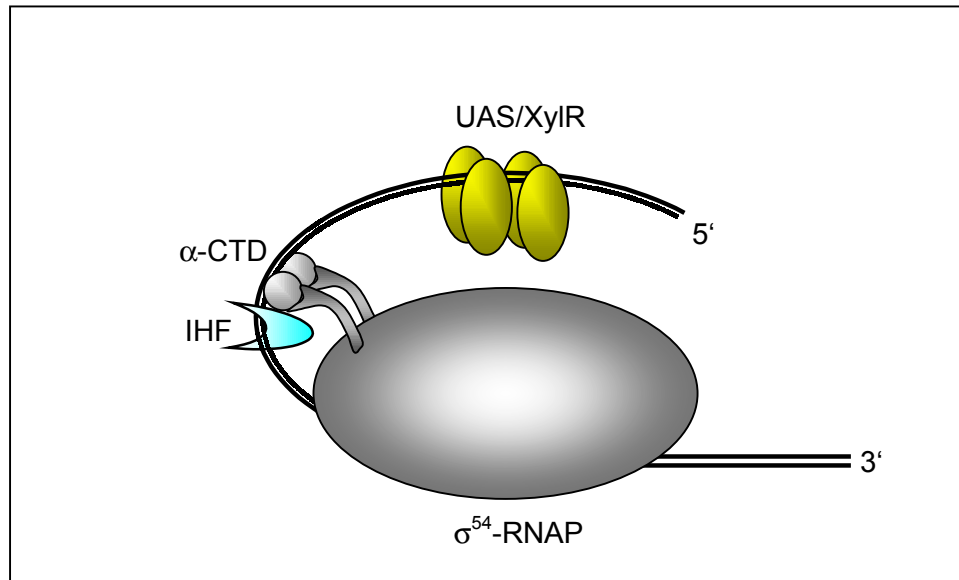


Abb. 1.3: Modell der Aktivierung des Pu-Promotors (DNA und dargestellte Proteine sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben).

Obwohl die Struktur des Ps1-Promotors der von Pu gleicht, spielt IHF keine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Ps. Anstelle von IHF ist das HU-Protein, welches wie IHF zu den Histon-ähnlichen Proteinen gehört, an der Aktivierung von Ps1 zu einem gewissen Teil beteiligt (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). HU scheint nicht in gleichem Maße für die Ps1-Promotor-Aktivität erforderlich zu sein wie dies im Fall von IHF für die Pu-Aktivität in *P. putida* gilt, da in einer *E. coli*-HU⁻-Mutante noch etwa 35 % der Ps1-Aktivität des Wildtyps erreicht wurden. Dies erklärt sich wohl dadurch, daß bereits ein leichter Knick in dem DNA-Abschnitt zwischen den UAS und der -12/-24-Region durch die Basensequenz in diesem Bereich selbst vorgegeben wird (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). Da HU im Gegensatz zu IHF keine spezifische Bindungssequenz in der DNA erkennt und auch durch seine Bindung an DNA keinen Knick in eine ganz bestimmte Richtung induziert, sollte der Effekt von HU in Ps1 nur in der Verstärkung des bereits existierenden Knicks in der DNA bestehen (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a).

Wie bereits angesprochen, ist IHF zwar an der Aktivierung von Ps1 nicht beteiligt, jedoch scheint dieses Protein einen negativen Effekt auf Ps1 zu haben (Gomada *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1995; Marqués *et al.*, 1998). In der Ps1-Pr-Promotor-Region sind zwei IHF-Bindungsstellen lokalisiert, die von *E. coli*-IHF bei relativ hoher IHF-Konzentration auch

gebunden werden (Holtel *et al.*, 1995). Weiterhin wurde in einer IHF⁻-Mutante von *P. putida* eine starke Zunahme der Transkription durch Ps1 beobachtet (Marqués *et al.*, 1998).

Die beiden Histon-ähnlichen Proteine IHF und HU beeinflussen also als sog. Ko-Regulatoren des Pu- bzw. des Ps1-Promotors die Transkription der Gene des oberen Abbaufweges bzw. des *xylS*-Gens, dessen Produkt dann für die Expression des *meta*-Abbaufweges verantwortlich ist. Somit besitzen IHF und HU eine bedeutende Funktion im „fine tuning“ der Expression der *xyl*-Abbaugene.

1.4 Histon-ähnliche Proteine in Eubakterien

Das bakterielle Chromosom ist ein ca. 5000-6000 kb (4700 kb bei *E. coli* bzw. ca. 6000 kb bei *P. putida* KT2440) großes DNA-Molekül, das meistens zirkulär und in negativ überspiralisierter Form in der Zelle vorliegt (Krawiec & Riley, 1990; Ramos-Diaz & Ramos, 1998). Die Länge dieses DNA-Moleküls beträgt in gestreckter Form ca. das 1000-fache der Länge einer Bakterienzelle. Damit Prozesse wie Replikation, Rekombination und Transkription effektiv ablaufen können, liegt die DNA systematisch gepackt in der Zelle vor. Die erforderliche rationale Packung der DNA leisten die Histon-ähnlichen oder auch Nukleoid-assoziierten Proteine, die zusammen mit der DNA, Polymerasen und weiteren regulatorischen Proteinen das Nukleoid bilden (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987). Die DNA bildet im Nukleoid zahlreiche schleifenförmige Domänen, die von den Histon-ähnlichen Proteinen zu Nukleosom-ähnlichen Strukturen weiter kondensiert werden (Rouvière-Yaniv *et al.*, 1979). Diese Strukturen haben allerdings kaum Ähnlichkeit zu den eukaryotischen Nukleosomen, bei denen die DNA um einen Kern aus Histon-Oktameren gewunden ist. Eine Intermediärform bilden hierbei offenbar bestimmte Archaeobakterien aus, deren DNA perlenkettenartig um Kerne aus Histon-Proteinen gewunden ist, die auch klare Homologien zu den eukaryotischen Histonen aufweisen (Sandman *et al.*, 1998).

Die Gruppe der Histon-ähnlichen Proteine umfaßt hauptsächlich die vier Proteine HU (heat-unstable nucleoid protein), IHF (integration host factor), H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) und Fis (factor for inversion stimulation), die alle auch in relativ hoher Konzentration im Nukleoid gefunden werden (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987; Murphy & Zimmerman, 1997). Alle diese Histon-ähnlichen Proteine binden an DNA und verändern dabei die DNA-Konformation derart, daß durch Kurven- und Schleifenbildung eine Kompaktierung der DNA erreicht wird. Hierbei beeinträchtigen sie natürlich alle die zellulären Prozesse, bei denen die Topologie der DNA eine bedeutsame Rolle spielt, wie z. B. die Regulation der Genexpression sowie DNA-Rekombination und -Replikation (Drlica &

Rouvière-Yaniv, 1987; Schmid, 1990). Die Funktion der Histon-ähnlichen Proteine wurde bisher hauptsächlich in *E. coli* untersucht, obwohl auch in anderen Bakterien sowie in eukaryotischen Organellen homologe oder auch analoge Proteine existieren (Briat *et al.*, 1984, Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996).

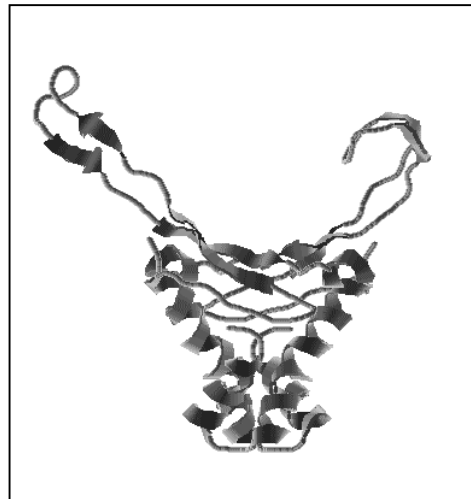


Abb. 1.4: Schematische Darstellung von HUBst, einem HU-homologen Protein aus *Bacillus stearothermophilus* auf der Grundlage von kristallographischen und NMR-Daten (Vis *et al.*, 1995). HUBst besitzt identische Untereinheiten und bildet einen globulären, basischen Körper, von dem aus die langen Arme als β -Faltblatt-Strukturen herausragen. Beide Arme sind sehr flexibel, angedeutet durch die in der Abb. dargestellten unterschiedlichen Konformationen. Sie umschließen und binden die DNA in der kleinen Furche und induzieren dadurch in der Bindungsregion einen Knick in der DNA.

In *E. coli*-Zellen ist von den Proteinen dieser Gruppe HU mit einer mittleren intrazellulären Konzentration von etwa 30.000 Molekülen pro Zelle (Azam *et al.*, 1999) eines der am häufigsten vertretenen Proteine, wobei es erhebliche Wachstumsphasen-abhängige Variationen dieser Konzentration gibt. Im Mittel ist somit also bei einer Chromosomengröße von etwa 5000 kb alle 150-200 bp ein HU-Molekül gebunden. HU ist ein dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa und besitzt lange „Arme“, die die DNA in der kleinen Furche binden (Abb. 1.4). Die beiden Untereinheiten (jeweils ca. 9 kDa) weisen untereinander eine Homologie von 70 % auf und werden von den Genen *hupA* bzw. *hupB* codiert (Kano *et al.*, 1985, 1987). Diese sind auf dem *E. coli*-Chromosom in unterschiedlichen Regionen lokalisiert (Kano *et al.*, 1986, 1988), wo sie von Promotoren kontrolliert werden, die ihrerseits in ihrer Expression von den Proteinen CRP (cyclic AMP receptor protein) und Fis abhängig sind (Claret & Rouvière-Yaniv, 1996). Die Zusammensetzung von *E. coli*-HU aus den α - bzw. β -Untereinheiten ist nicht konstant, sondern ändert sich im Verlauf der Wachstumskurve: in der exponentiellen Wachstumsphase besteht HU zu etwa gleichen Teilen

aus α_2 -Homodimeren und $\alpha\beta$ -Heterodimeren, während in der stationären Phase das $\alpha\beta$ -Heterodimer überwiegt (Claret & Rouvière-Yaniv, 1997). Daß das in sehr geringer intrazellulärer Konzentration vorkommende β_2 -Homodimer *in vivo* so gut wie keine Rolle spielt, konnte auch *in vitro* bestätigt werden, da β_2 -HU andere DNA-Bindungseigenschaften als α_2 -HU oder $\alpha\beta$ -HU aufweist und auch keine negative Überspiralisierung in DNA induzieren kann (Claret & Rouvière-Yaniv, 1997; Pinson *et al.*, 1999).

HU bindet DNA relativ unspezifisch, also nicht an definierten Erkennungssequenzen, es scheint aber bestimmte DNA-Strukturen wie Knicke, Einzelstrangbrüche oder „four-way junctions“ (welche bei Rekombinationsprozessen entstehen) zu erkennen und bevorzugt zu binden (Pontiggia, *et al.*, 1993; Bonnefoy *et al.*, 1994; Castaing *et al.*, 1995). Die Bedeutung von HU für die Zelle wird in *hupA/hupB*-Doppelmutanten von *E. coli* deutlich: diese Zellen besitzen massive Defekte im Zellwachstum, Zellteilung, Phagenvermehrung, Temperaturtoleranz und in ihrer Fähigkeit zur DNA-Reparatur (Wada *et al.*, 1988; Huisman *et al.*, 1989; Boubrik & Rouvière-Yaniv, 1995; Li & Waters, 1998).

Anders als in den *Enterobacteriaceae* scheint HU in anderen Bakterien-Spezies ein homodimeres Protein zu sein, da diese nur ein einziges HU-Gen besitzen (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996).

IHF als ein weiteres Histon-ähnliches Protein weist sowohl Sequenzhomologien wie auch strukturelle Ähnlichkeit zu HU auf. Es besteht in allen bisher untersuchten Bakterien aus zwei jeweils etwa 11 kDa großen Untereinheiten (IhfA bzw. IhfB, früher HimA und HimD) mit etwa 25 % Homologie zueinander, was dem Molekül eine leicht asymmetrische Form verleiht. Wie bei HU ändert sich die intrazelluläre Konzentration von IHF (im Mittel ca. 30.000 Moleküle pro Zelle) mit den Wachstumsphasen, dies jedoch eben nicht in konzertierter Weise, sondern es ergeben sich so für die verschiedenen Wachstumsphasen drastische und charakteristische Unterschiede zwischen den HU- und IHF-Konzentrationen (Azam *et al.*, 1999). IHF bindet spezifisch an eine definierte, 13 bp umfassende Consensus-Sequenz in der DNA (5'-WATCAANNNTTTR-3', mit W = A oder T; N = A,C,G oder T; R = A oder G), womit wie im Fall von HU die Biegung dieser DNA-Region einhergeht. Aufgrund dieser Eigenschaften wirkt IHF an zahlreichen zellulären Vorgängen wie Transpositions- und Inversionsprozessen, der sequenzspezifischen Phagen-Rekombination sowie an der positiven oder negativen Modulation der Expression verschiedener Gene mit (Friedman, 1988; Freundlich *et al.*, 1992).

Neben der Funktion, als Hilfsprotein bei der Ausbildung der DNA-Topologie mitzuwirken und somit ggf. als Ko-Regulator die Regulation der Genexpression zu beeinflussen, kann IHF auch als Aktivator direkt an der Transkription beteiligt sein. Beispielsweise ist zur Initiation der Transkription am pL-Promoter des Phagen λ die Wechselwirkung zwischen IHF und dem C-terminalen Teil der α -Untereinheit der RNA-Polymerase (α -CTD) notwendig (Giladi *et al.*, 1992a).

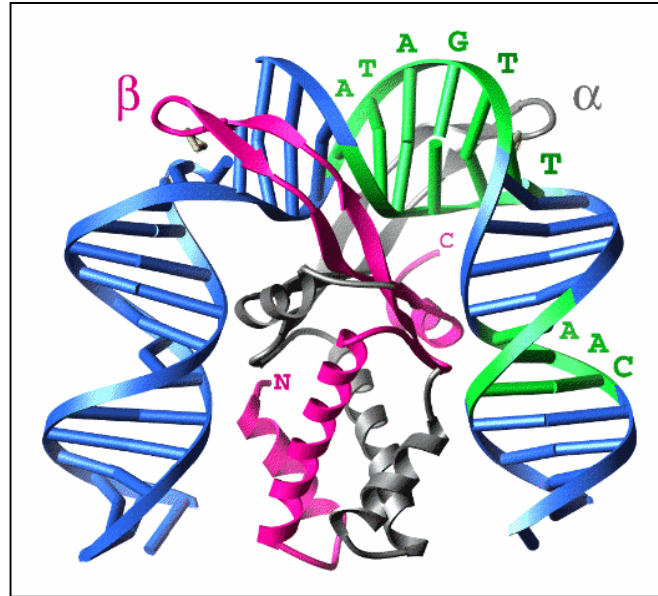


Abb. 1.5: Modell eines IHF-DNA-Komplexes. IHF wurde mit einem 35 bp Oligonukleotid, welches eine IHF-Bindungsstelle enthielt, kristallisiert und röntgenstrukturanalytisch untersucht (Rice *et al.*, 1996). Die Buchstaben „ATAGT...AAC“ stellen Teile der Bindungssequenz dar. Die beiden IHF-Untereinheiten (IhfA und IhfB) sind durch „α“ und „β“ an den jeweiligen Protein-Armen gekennzeichnet. Die Buchstaben „N“ und „C“ deuten den entsprechenden Peptid-Terminus der IhfB-Untereinheit an.

Aufschluß über die genauen Wechselwirkungen zwischen IHF und seiner DNA-Bindungsregion lieferten kristallographische Daten, die von einem Kristall aus IHF und einem Oligonukleotid mit der IHF-Bindungssequenz erhalten wurden (Rice *et al.*, 1996). Wie in Abb. 1.5 zu sehen ist, binden die beiden Arme von IHF in der kleinen Furche der DNA. An der Spitze der beiden Arme befindet sich jeweils ein Prolin-Rest, der sich zwischen die Basen der DNA schiebt (Interkalation) und so die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Basen aufhebt, was die Biegung der DNA erleichtert. Zudem stabilisieren Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen dem IHF-Körper und den Phosphatgruppen der DNA auf der Innenseite der Biegung diese veränderte Struktur. Die DNA wird auf diese Weise von IHF zu einem Winkel von über 160° gebogen.

Innerhalb der gramnegativen Bakterien ist IHF ein ziemlich strikt konserviertes Protein (Haluzi *et al.*, 1991) und daher in verschiedenen Organismen auch an der Expression zahlreicher σ^{54} -abhängiger Gene beteiligt. Hierzu zählen, neben den Genen für den oberen Abbauweg auf dem TOL-Plasmid von *P. putida*, beispielsweise als weiter gut untersuchte Systeme die Gene für die Stickstofffixierung in *Klebsiella pneumoniae*, die Gene für die Alginatsynthese in *Pseudomonas aeruginosa* sowie die Gene für die Synthese der Geißel von *Caulobacter crescentus* (Gober & Shapiro, 1990; Hoover *et al.*, 1990; Toussaint *et al.*, 1993).

1.5 Rolle der Histon-ähnlichen Proteine IHF und HU in der Expression katabolischer *xyl*-Operons in *Pseudomonas putida*: Ziel dieser Arbeit

IHF und HU sind an der Regulation der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 beteiligt, welche die Expression der Gene des oberen Abbauweges sowie des XylS-Gens auf dem TOL-Plasmid pWW0 in *P. putida* kontrollieren (siehe 1.3.2.6). Die Funktion von IHF bei der Aktivierung von Pu besteht dabei wohl nicht allein in der Bildung einer geeigneten DNA-Topologie, die das Aktivatorprotein XylR und die σ^{54} -RNA-Polymerase in physischen Kontakt bringt. Zusätzlich ermöglicht IHF der RNA-Polymerase, ein weiteres Pu-Promotorelement zu erkennen, was wiederum die Affinität der RNA-Polymerase für Pu erhöht. Zudem besitzt IHF auch die Funktion eines Restriktors, der die unspezifische Stimulierung der Expression des oberen Operons durch verwandte Aktivatoren anderer Systeme unterdrückt (Pérez-Martín & de Lorenzo 1995c). Im Ps1-Promotor dagegen scheint IHF eine reprimierende Funktion zu besitzen, während HU hier die Flexibilität der DNA im Bereich zwischen Ps1 und den UAS erhöht, was den Kontakt zwischen dem an den UAS gebundenen XylR und der σ^{54} -RNA-Polymerase am Promotor ermöglicht.

Alle Untersuchungen zur Rolle von IHF und HU bei der Regulation der Promotoren Pu und Ps1 wurden bisher im heterologen *E. coli*-Background, d.h. in entsprechenden IHF- bzw. HU-defizienten *E. coli*-Mutanten durchgeführt. Zwar wurden bereits die für das *P. putida*-IHF-Protein codierenden Gene (*ihfA*, *ihfB*) isoliert, sequenziert und als weitgehend den *E. coli*-IHF-Genen homolog erkannt, entsprechende Ergebnisse hinsichtlich der für ein HU-homologes Protein codierenden Gene in *P. putida* standen jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch aus. Beobachtete Unterschiede in der Pu-Promotor-Aktivität im *E. coli*- bzw. *P. putida*-Background lassen zudem darauf schließen, daß sich die Wechselwirkungen zwischen den regulatorischen Komponenten in *P. putida* teilweise von denen in *E. coli* unterscheiden (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a; Calb *et al.*, 1996). Möglicherweise sind hierbei die wirtsspezifischen Affinitäten zwischen den Proteinen (σ^{54} -RNAP, XylR, IHF und HU) bzw. zwischen den Proteinen und der Promotor-DNA für die beobachteten Unterschiede *in vivo* bei *P. putida* und *E. coli* verantwortlich. Weiterhin ist *P. putida* als Bodenbakterium anderen Umweltbedingungen ausgesetzt als das im Intestinaltrakt lebende Enterobakterium *E. coli*, so daß es sicher in anderer Weise auf Umweltsignale wie z.B. Temperaturänderungen reagieren wird.

Um diese Unterschiede in weiteren Regulationsstudien nun dezidiert adressieren zu können, soll hier erstmals ein *in vitro*-Transkriptionssystem etabliert werden, das ausschließlich aus Proteinkomponenten von *P. putida* besteht.

Hierzu sollen sämtliche, nach derzeitigem Wissensstand zur Aktivierung der Promotoren Pu und Ps1 notwendigen Komponenten aus *P. putida* isoliert werden, d. h. das

RNA-Polymerase-Core-Enzym, der spezifische RNA-Polymerase-Sigma-Faktor σ^{54} , sowie die Histon-ähnlichen Proteine IHF und HU. Der für die Aktivierung beider Promotoren notwendige Aktivator XylR wurde im Labor von Víctor de Lorenzo (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien) bereits in konstitutiv aktiver Form (XylR Δ A) aufgereinigt und stand im Rahmen einer Kooperation auch für diese Arbeit zur Verfügung.

Mit Hilfe dieses „reinen“ *P. putida*-Transkriptionssystems sollen in dieser Arbeit dann exemplarisch spezifische Untersuchungen zur Rolle der DNA-bindenden Histon-ähnlichen *P. putida*-Proteine in der Regulation der Pu- und Ps1-Promotoraktivitäten durchgeführt werden. Weiterhin soll untersucht werden, welchen Einfluß die Histon-ähnlichen Proteine aus *P. putida* auf die Modulation der Promotoraktivität speziell bei der Transmission von Umweltsignalen (wie z.B. Temperatur) ausüben.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Autoklaven	Tecnomara
Brutschränke	Heraeus 5042
Bunsenbrenner	Tecnomara, Fireboy
Computer	IBM-PC, Apple Macintosh
Densitometer	GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad
DNA-Sequencer	373A DNA Sequencing System, Applied Biosystems
Elektroelutionskammer	Biotrap BT 1000, Schleicher & Schuell
Elektrophoresekammer	BRL Horizon 58 und 11-14
Elektroporationsgerät	Bio-Rad Gene Pulser
Feinwaage	Mettler PM460 und AE260
Filmentwicklungsmaschine	Agfa Curix X60
FPLC	Pharmacia
French Press	SLM Aminco
Geldokumentation	Herolab E.A.S.Y. System
Kühlzentrifuge	Sorvall RC5C, DuPont
Lichtmikroskop	Zeiss
Magnetrührer	Framo-Gerätetechnik M24/1
Mikrowellenofen	Brother Powerwave
PCR-Thermocycler	Landgraf TC Varius V, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
pH-Meter	Schott CG804
Photoimager	Gel Video-System, Enhanced Analysis System E.A.S.Y. 439 K, Herolab
Pipetten	Variopipetten der Firmen Gilson und Eppendorf, Hirschmann Pipetus-akku
Protein-Blot	Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad
Proteingelkammer	Bio-Rad Mini Protean II Cell
Rotationsschüttler	New Brunswick EDISON G-53, Infors HAT, Edmund Bühler SM25
Southern-Blot Apparatur	Posiblot 30-30 Pressure Blotter, Stratagene
Spannungsgeräte	Pharmacia GPS 200/400, Gibco BRL ST504, ST606T
Spektrophotometer	Beckmann DU-70, Hitachi U 2000
Sterilbank	Heraeus LaminAir HLB 2472
Thermoblock	Modell 5436, Eppendorf

Tischinkubator	Eppendorf Thermostat 5320
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 C, Heraeus Sepatech Biofuge 13
UV-Crosslinker	Stratalinker, Stratagene
Vakuum Zentrifuge (Speed Vac)	Savant DNA Speed Vac DNA A110
Vortex	Bender & Hobein Vortex Genie 2
Wasserbad	Köttermann
Wasserreinigungssystem	Millipore Milli-Q

2.2 Verwendete Chemikalien

Wenn nicht anders beschrieben, wurden handelsübliche Chemikalien des Reinheitsgrades "Zur Analyse" verwendet. Die Chemikalien stammten von den Firmen Merck, Fluka, Riedel deHaen, Sigma, Serva und Roth. Bei der Herstellung von Minimalmedien, Puffern und Lösungen wurde grundsätzlich hoch gereinigtes Wasser (Milli-Q, Millipore) verwendet. Eine Ausnahme bildete das LB-Komplexmedium, welches lediglich mit deionisiertem Wasser zubereitet wurde.

2.3 Nährmedien, Puffer, Lösungen und Enzyme

2.3.1 Vollmedien für Bakterien

LB-Medium (Luria-Bertani; Sambrook *et al.*, 1989):

Bacto-Trypton (Difco)	10,0 g/l
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l
H ₂ O (deion.)	<i>ad</i> 1 Liter

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Das Medium wurde sowohl flüssig als auch in fester Form (nach Zugabe von 15,0 g/l Bacto-Agar (Difco)) verwendet.

SOB-(SOC)-Medium (Sambrook *et al.* 1989):

Bacto-Trypton (Difco)	20,0 g/l
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g/l
NaCl	10,0 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM

Das SOC-Medium enthält noch zusätzlich 20 mM Glucose, die in entsprechender Menge als 2M Lösung (sterilfiltriert) hinzugegeben wurde. Zur Herstellung der Medien wurden die Magnesiumverbindungen getrennt autoklaviert.

2.3.2 Minimalmedium für Pseudomonaden

Zur Herstellung eines definierten Minimalmediums wurden zunächst getrennt bereitgestellt:

1. M9-Salze (Sambrook *et al.*, 1989):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	12,8 g/l
KH_2PO_4	3,0 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH_4Cl	1,0 g/l

Die M9-Salze wurden 10-fach konzentriert in Milli-Q-Wasser hergestellt, mit NaOH auf pH 7,0-7,2 eingestellt und autoklaviert.

2. Pseudomonas-Spurenelementlösung („goodies“):

Die *Pseudomonas*-Spurenelementlösung (Bauchop & Elsdén, 1960) besteht aus drei Lösungen, die im Verhältnis A : B : C = 2 : 1 : 1 zusammengegeben werden:

Lösung A (autoklaviert):	- MgO	10,75 g/l
	- CaCO_3	2,00 g/l
	- $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4,50 g/l
	- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,44 g/l
	- $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,12 g/l
	- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
	- $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,28 g/l
	- $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,06 g/l
	- HCl (konz.)	51,30 ml

Lösung B (autoklaviert):	$\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1 mol/l
--------------------------	--	---------

Lösung C (sterilfiltriert):	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	36 mmol/l
-----------------------------	--	-----------

Das fertige *Pseudomonas*-Minimalmedium wurde dann wie folgt angesetzt (pro 1 Liter):

M9-Salze (10-fach konz.)	100,0 ml
<i>Pseudomonas</i> -Spurenelementlösung	2,5 ml
Kohlenstoffquelle	5 - 20 mM
Milli-Q-H ₂ O	ad 1 Liter

Für die Herstellung von Mineralagarplatten wurden zunächst 15 g/l Agar (Purified Agar, Oxoid) in Milli-Q-Wasser gelöst und autoklaviert. Danach wurden entsprechende Mengen M9-Mineralmedium (10-fach konz.), *Pseudomonas*-Spurenelementlösung und Kohlenstoffquelle zugesetzt, um auf dieselben Endkonzentrationen zu kommen, wie sie im o.a. flüssigen Medium erreicht werden.

2.3.3 Antibiotika und sonstige Medienzusätze

Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen verwendet:

Tabelle 2.1: Eingesetzte Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration in Medien
Ampicillin (Amp)	150 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C	150 µg/ml
Chloramphenicol (Cm)	50 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei -20 °C	50 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C	50 µg/ml
Rifampicin (Rif)	50 mg/ml in DMSO, Lagerung bei -20 °C	50 µg/ml
Streptomycin (Sm)	100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C	70-100 µg/ml
Tellurit ¹ (Tel)	40 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C	40 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in Ethanol, Lagerung bei -20 °C	10-20 µg/ml

¹: Tellurit ist eine Schwermetallverbindung und wird wie ein Antibiotikum als Selektionsmarker eingesetzt.

IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid):

0,1 M in H₂O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid):

20 mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C

2.3.4 Puffer

Alle Puffer wurden nach der Herstellung autoklaviert.

Puffer zum Lösen von DNA:

TE:

- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) 10 mM
- EDTA 1 mM
- pH 8,0 (mit HCl)

Zum Lösen von DNA wurde weiterhin Tris · HCl (pH 8,0) und steriles Milli-Q-Wasser eingesetzt.

Laufpuffer für Agarosegele (50-fach konz.):

50 × TAE:

- Tris-Base 2,0 M
- EDTA 50 mM
- Eisessig 57,1 ml/l

Durch entsprechendes Verdünnen der Puffer-Stammlösungen wurden die Arbeitskonzentrationen hergestellt (z.B. 1xTAE).

Laufpuffer für denaturierende Polyacrylamidgele (10-fach konz.):

10 × TBE:

- Tris-Base 54 g
- Borsäure 27,5 g
- 0,5 M EDTA (pH 8,0) 20 ml
- Milli-Q-H₂O *ad* 1000 ml

2.3.5 Enzyme

Die verschiedenen Enzyme (Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligasen und Phosphatasen) wurden von Amersham, Boehringer-Mannheim, Gibco-BRL, Invitrogen, MBI, New England Biolabs, Pharmacia, Qiagen und Stratagene bezogen und in den von den jeweiligen Herstellern empfohlenen Endkonzentrationen eingesetzt.

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

In den folgenden Tabellen 2.2 und 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Stämme und Plasmide aufgeführt:

Tabelle 2.2: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Bacillus subtilis</i> :		
BG405	<i>rec⁺ hbs4755 Cm^R</i>	Fernandez <i>et al.</i> , 1997
<i>Escherichia coli</i> :		
BL21 (DE3)	<i>hsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene I)</i>	Studier & Moffatt, 1986
BL21 (DE3) JW186	BL21 (DE3), <i>himA::Tn10 (Tet^R)</i> , <i>himD::Cm^R</i>	Delic-Attree <i>et al.</i> , 1996
CC118	$\Delta(ara-leu) araD \Delta lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1$	Maniol & Beckwith, 1985
CC118λpir	CC118, λpir-Phage Lysogen	Herrero <i>et al.</i> , 1990
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
HB101	<i>recA hsdR⁻ hsdM⁺ strA pro leu thi Sm^R</i>	Boyer & Roulland-Dussoix, 1969
INVαF'	F' <i>endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U196 λ⁻</i>	Invitrogen
TH1	<i>thi endA hsr ΔlacU169 hutC_{Klebs} ΔrpoN</i>	Bertoni <i>et al.</i> , 1997
TOP10F'	F' { <i>lacIq Tn10 (Tet^R)</i> } <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Pseudomonas putida</i> :		
KT2442	<i>hsdR1 hsdM⁺Rif^R</i>	Franklin <i>et al.</i> , 1981
KT2442 <i>Ps::lacZ</i>	<i>hsdR1 hsdM⁺Rif^R xylR⁺ Ps::lacZ Tel^R</i>	Diese Arbeit
KT2442 $\Delta hupB$	<i>hsdR1 hsdM⁺Rif^R xylR⁺ Ps::lacZ Tel^R ΔhupB</i>	Diese Arbeit
KT2442 $\Delta hupN$	<i>hsdR1 hsdM⁺Rif^R xylR⁺ Ps::lacZ Tel^R ΔhupN</i>	Diese Arbeit
KT2442 $\Delta hupBN$	<i>hsdR1 hsdM⁺Rif^R xylR⁺ Ps::lacZ Tel^R ΔhupB ΔhupN (pFBT22)</i>	Diese Arbeit

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBBR1MCS-2	broad host range-Vektor, Kan ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBKT7-1+ntrA	<i>ntrA (=rpoN)</i> unter Kontrolle eines T7-Promotors, Amp ^R	V. de Lorenzo

pCB8	Plasmid für β -Rekombination, Amp ^R	Rojo & Alonso, 1994
pCB188	enthält das <i>hbs</i> wt-Gen aus <i>B. subtilis</i> , Amp ^R , Cm ^R	Fernandez <i>et al.</i> , 1997
pCR 2.1	Klonierungsvektor für <i>Taq</i> -PCR-Produkte, Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pET-3d	<i>E. coli</i> T7-Expressionsvektor, Amp ^R	Stratagene
pEZ9	pUC18 mit Pu-Promotor-Fragment, Amp ^R	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1991
pEZ10	pTE103 mit Pu-Promotor-Fragment, Amp ^R	V. de Lorenzo
pFBT1	pCR2.1 mit <i>ihfA</i> aus <i>P. putida</i> (<i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT2	pCR2.1 mit <i>ihfB</i> aus <i>P. putida</i> (<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT4	pTrc99A mit <i>ihfAB</i>	Diese Arbeit
pFBT5	pT7-7 mit <i>ihfB</i> (<i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT6	pT7-7 mit <i>ihfBA</i>	Diese Arbeit
pFBT7	pET-3d mit <i>ihfA</i> (<i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT8	pZErO-2 mit einem 6 kb großen, chromosomalen <i>Sac</i> I-Fragment aus <i>P. putida</i> (pFBT8a, pFBT8b und pFBT8c sind identisch)	Diese Arbeit
pFBT9	pCR2.1 mit <i>ihfA</i> (<i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT10	pCR2.1 mit <i>hupN</i> aus <i>P. putida</i> (<i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT12	pET-3d mit <i>hupN</i> (<i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT13	pFBT7 mit zusätzlichem T7- <i>ihfA</i> -Fragment	Diese Arbeit
pFBT14	pCR2.1 mit <i>hupB</i> aus <i>P. putida</i> (<i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT15	pFBT13 mit <i>ihfB</i> , IHF-Expression	Diese Arbeit
pFBT16	pVLT33 mit <i>hupN</i> -Fragment (<i>Xba</i> I- <i>Bam</i> HI) aus pFBT12	Diese Arbeit
pFBT17	pT7-7 mit <i>hupB</i> (<i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment)	Diese Arbeit
pFBT18	pVLT33 mit <i>hupB</i> -Fragment (<i>Xba</i> I- <i>Bam</i> HI) aus pFBT17	Diese Arbeit
pFBT19	pTrc99A mit <i>rpoN</i> aus pBKT7-1+ <i>ntrA</i>	Diese Arbeit
pFBT22	pFBT18 mit <i>xylE</i> aus pXYLE1	Diese Arbeit
pHP13	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle-Vektor, Cm ^R	Haima <i>et al.</i> , 1987
pHP13- <i>hupB</i>	pHP13 mit <i>hupB</i> aus <i>P. putida</i>	Diese Arbeit
pHP13- <i>hupN</i>	pHP13 mit <i>hupN</i> aus <i>P. putida</i>	Diese Arbeit
pKNG101	Vektor für die Konstruktion chromosomaler Insertionen, Sm ^R	Kaniga <i>et al.</i> , 1991
pLysS	Expression geringer Mengen an T7-Lysozym, Cm ^R	Studier <i>et al.</i> , 1990
pRK600	ColE1, RK2-Mob ⁺ RK2-Tra ⁺ , Helfer-Plasmid bei Konjugationen, Cm ^R	Kessler <i>et al.</i> , 1992
pT7-7	<i>E. coli</i> T7-Expressionsvektor, Amp ^R	Stan Tabor

pTE103	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor mit Transcriptions-Terminator stromabwärts vom Polylinker, Amp ^R	Elliot & Geiduschek, 1984
pTE103-Ps	pTE103 mit Ps-Promotor-Fragment	M. Carmona
pTK19	pKT231 mit einem 2,6 kb großen <i>HpaI</i> -Fragment (<i>xylR</i> -Pr-Ps-Region) des TOL-Plasmids, Km ^R	Thilo Köhler
pTrc99A	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor, Amp ^R	Amann <i>et al.</i> , 1988
pUC18	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor, Amp ^R	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC18Not	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor, Amp ^R	Herrero <i>et al.</i> , 1990
pUJ8	Vektor zur Konstruktion von Promotor- <i>lacZ</i> -Fusionen, Amp ^R	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
pUT mini-Tn5-Tel	Transposon-Vektor, Amp ^R , Tel ^R	Sanchez Romero <i>et al.</i> , 1998
pVLT33	Expressionsvektor, broad host range, Km ^R	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1993
pXYLE1	enthält <i>xylE</i> , Km ^R	Stein, 1992
pZErO-2	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor, Km ^R	Invitrogen

2.5 Stammhaltung und Zellanzucht

Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zunächst bei 30 °C (*P. putida*) oder 37 °C (*E. coli*) über Nacht angezogen. Zur kurzfristigen Lagerung dieser Zellen wurden die Platten bei 4 °C aufbewahrt und nach ca. 1 Monat neu überimpft. Zur Herstellung von Flüssigkulturen wurden zunächst ca. 3 ml flüssiges Medium mit Antibiotikum oder Minimalmedium mit wenig Zellmaterial von einer Agarplatte beimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht und zwar für *E. coli* bei 37 °C und für *P. putida* bei 30 °C. Die entsprechenden Großkulturen unterschiedlichen Volumens wurden durch Hinzufügen von 0,1-0,01 Vol. Übernachtskultur (ÜN-Kultur) beimpft und wie oben angegeben inkubiert.

Zur längeren Lagerung bei -70 °C wurden Glycerinkulturen hergestellt. Hierzu wurden 1,4 ml ÜN-Kultur in Selektivmedium mit 400 µl 87 % (v/v) Glycerin (steril) gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.6 Messung der Bakterienzeldichte

Die Messung der optischen Dichte (OD) als Maß für die Mikroorganismen-Konzentration wurde bei der Wellenlänge von 600 nm und einer Schichtdicke von 1 cm an einem Beckmann DU-70 oder einem Hitachi U2000 Spektrophotometer durchgeführt. Zum Abgleich wurde die jeweilige zellfreie Nährlösung verwendet.

2.7 Molekularbiologische Standardtechniken zur DNA-Isolierung und -Modifizierung

Soweit nicht anders angegeben, sind die Protokolle Sambrook *et al.* (1989) entnommen.

2.7.1 Schnelles Screening zur Analyse rekombinanter Plasmide

Mit dem Protokoll von Le Gouill & Dévy (1991) wurden Bakterienkolonien aus Transformationen auf das Vorhandensein von Plasmiden mit erwarteter Größe untersucht. Hierbei wird zunächst wenig Zellmaterial von Agarplatten lysiert. Anschließend wird nach Zentrifugation des gesamten Ansatzes die DNA im Überstand in einem Agarosegel (siehe 2.7.6) aufgetrennt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß in kurzer Zeit eine große Zahl von Klonen getestet werden kann.

2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur schnellen Präparation von Plasmiden aus kleinen Kulturvolumina (1,5-5 ml) wurde das "Qiaprep Spin Miniprep Kit" der Firma Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers verwendet. Für die Plasmidpräparation aus größeren Kulturen wurde das "Qiagen Plasmid Midi Kit" oder das "Qiagen Plasmid Maxi Kit" der gleichen Firma verwendet. Der Ablauf der Qiagen-Plasmidpräparation besteht aus vier Schritten: Herstellung eines Bakterienlysates, Adsorption der DNA an eine Silikatmembran, Herauswaschen von Verunreinigungen und schließlich die Elution der Plasmid-DNA.

2.7.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus Bakterienzellen

Für die Klonierung des *hupB* Gens aus *P. putida* sowie als Template für PCR-Reaktionen wurde chromosomale DNA aus *P. putida* KT2442 benötigt. Die Methode wurde wie bei Ausubel *et al.* (1994) beschrieben durchgeführt. In dem Protokoll wird zunächst eine Bakteriensuspension lysiert und anschließend mit einer 10%-igen CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid)-Lösung versetzt, wobei Polysaccharide und Zelltrümmer präzipitiert werden. Nach einer Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol und Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (s. 2.7.4) wird dann eine Ethanolfällung durchgeführt (s. 2.7.5).

2.7.4 Reinigung von DNA-Lösungen durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode wird zur Reinigung von DNA, die mit Proteinen verunreinigt ist, eingesetzt, um anschließende Schritte (wie z.B. DNA-Manipulationen) effizient durchführen zu können. DNA-haltige Lösungen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem jeweils

gleichen Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1, Roth) versetzt und durch Hin- und Herschwenken so lange gemischt, bis eine homogene Emulsion entstand. Zur Phasentrennung wurde anschließend 30 sec bei 12.000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Die obere, DNA-haltige Phase wurde ohne die Interphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung wurde so lange wiederholt, bis in der Interphase kein Protein-Präzipitat mehr zu sehen war (in der Regel 1-3mal). Schließlich wurde die obere, nun weitgehend Protein-freie DNA-haltige Phase mit einem gleichen Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erneut extrahiert, um gelöstes Phenol zu entfernen.

2.7.5 Ethanolfällung von DNA

Die Ethanolfällung wird durchgeführt, um DNA-Lösungen zu reinigen bzw. zu konzentrieren. Das ist generell der Fall nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion oder wenn das Volumen von DNA-Lösungen für nachfolgende Schritte reduziert werden muß. Hierzu wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wäßrige DNA-Lösungen mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 2,5 Vol eiskaltem Ethanol versetzt, gemischt und mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (30 min bei 13.000 Upm und 4 °C) wurde der Niederschlag mit 500 µl eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen und nochmals 10 min bei 13.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem gründlichen Entfernen des 70%igen Ethanols wurde das Pellet ca. 3 min in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und schließlich in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.7.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird durchgeführt, um DNA-Moleküle (Plasmide oder Fragmente) nach ihrer Größe aufzutrennen. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen zwischen 0,7 % (w/v) und 2,0 % (w/v) verwendet. Die entsprechende Agarosemenge (Seakem-Agarose, FMC Bioproducts) wurde in TAE-Puffer eingewogen und aufgeköcht. Die flüssige Agarose-Lösung wurde in eine Elektrophoresekammer (Horizon 58 oder Horizon 11-14, BRL) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 0,25 Vol. GMM-Ladepuffer (40 % (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA (pH8,0), 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol; nach Hofer und Kühlein, 1993) versetzt und die Gelelektrophorese wurde in TAE-Laufpuffer bei einer Spannung von 10-20 V/cm durchgeführt. Zum Anfärben der DNA wurde das Gel in ein Ethidiumbromid-Bad (1mg/ml in TAE-Puffer) gelegt und nach 10-30 min Einwirkzeit im UV-Licht mit dem Photoimager fotografiert.

Es wurden zwei unterschiedliche DNA-Molekulargewichtsmarker verwendet, die je nach Größe der zu analysierenden Fragmente eingesetzt wurden:

- 1) λ -Phagen-DNA (Boehringer Mannheim) geschnitten mit *Hind*III und *Bgl*II
 Fragmentgröße (bp): 22.010 8.232 5.327 4.776 4.361 2.322 2.027
 1.184 705 651 564 519 415 125
 60

- 2) "1 kb-Ladder" (Gibco-BRL)
 Fragmentgröße (bp): 12.216 11.198 10.180 9.162 8.144 7.162 6.108
 5.090 4.072 3.054 2.036 1.636 1.018 506
 517 396 344 298 220 201 154
 134 75

2.7.7 Extraktion von DNA-Banden aus einem Agarosegel

Nach Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe wurde die gewünschte Bande unter langwelligem UV-Licht (366 nm) als möglichst kleines Stück mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die sich anschließende Extraktion wurde in der Regel mit einem Kit der Firma Qiagen ("Qiaex II Gel Extraction") nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. In Fällen, wo hohe Effizienz und gute Qualität der DNA verlangt wurde (z.B. bei der Klonierung von Fragmenten aus genomischer DNA), wurde zur Fragmentextraktion eine Elektroelutionskammer nach dem zugehörigen Protokoll verwendet. Daran anschließend wurde die DNA-haltige Lösung mit Microcon-100-Konzentratoren (Amicon) nach der Vorschrift des Herstellers auf das gewünschte Volumen konzentriert.

2.7.8 Enzymatische Manipulationen von DNA

2.7.8.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen. So spalten Restriktionsenzyme der Klasse II DNA innerhalb einer jeweils 4 bis 8 Nukleotide langen Erkennungssequenz. Die Volumina der Inkubationsansätze wurden so gering wie möglich gehalten, je nach Konzentration der eingesetzten DNA zwischen 10 und 100 μ l. Ungefähr 0,5-3 μ g DNA wurde mit sterilem Wasser und kommerziell erhältlichem Restriktionspuffer für die entsprechenden Restriktionsenzyme versetzt. Nach Zugabe von 1-5 Units eines Restriktionsenzym wurden die Reaktionsansätze ca. 2 Stunden meistens bei 37 °C inkubiert (Inkubationszeit und -temperatur variierten je nach eingesetztem Enzym). Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 25 mM (Endkonzentration) EDTA gestoppt, oder es wurden die Restriktionsenzyme durch 15-minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

2.7.8.2 Auffüllen überhängender 5'-Enden durch das Klenow-Fragment

In Fällen, wo zur Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten keine kompatiblen Enden vorhanden sind, kann durch das Auffüllen überhängender Enden eine Blunt End-Ligation durchgeführt werden. Da das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I in allen Puffern für Restriktionsenzyme arbeitet, können hiermit überhängende 5'-Enden nach Reaktionsverdaus direkt anschließend im selben Reaktionsansatz aufgefüllt werden. Dazu werden dem Restriktionsverdau (bei 0,2-5,0 µg DNA in einem Vol von 20 µl) 1 µl einer dNTP-Lösung (1 mM je dNTP) sowie 1 Unit Klenow-Fragment pro 1 µg DNA hinzugefügt. Nach einer Inkubation von ca. 15 min bei RT werden die Enzyme wie beschrieben inaktiviert. Anschließend wird die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion (s.2.7.4) und nachfolgende Ethanolpräzipitation (s.2.7.5) gereinigt und konzentriert.

2.7.8.3 Phosphatasebehandlung von Vektor-DNA

Durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIP) werden die terminalen Phosphatgruppen an den 5'-Enden linearisierter Vektor-DNA abgespalten, wodurch eine Religation des Vektors verhindert wird.

Mit Restriktionsendonukleasen vollständig geschnittene Vektor-DNA wurde Phenol-extrahiert (2.7.4) und Ethanol-präzipitiert (2.7.5), in 90 µl sterilem Wasser aufgenommen, mit 10 µl des zehnfach konzentrierten CIP-Puffers (500 mM Tris · HCl (pH 9,0), 10 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, 10 mM Spermidin) sowie mit 1 Unit alkalischer Phosphatase versetzt. Nach je 15 minütiger Inkubation bei 37 °C und bei 56 °C wurde erneut 1 Unit alkalische Phosphatase zugesetzt und wie oben inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte durch Zugabe von 10 mM EDTA sowie 0,5 % SDS (w/v) und anschließendem Erhitzen auf 68 °C für 15 min. Schließlich wurde eine Phenolextraktion (s. 2.7.4) und Ethanolpräzipitation (s. 2.7.5) durchgeführt.

2.7.8.4 Ligation

Die T4-DNA-Ligase kann Restriktionsfragmente in Gegenwart von ATP verknüpfen.

Es wurden ca. 1 µg restriktionsverdauter Vektor-DNA mit dem zu inserierenden Fragment in einem molaren Verhältnis von etwa 1:3 (bei der Ligation kohäsiver Enden) bzw. 1:5 (bei der Ligation glatter Enden) versetzt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10-15 µl mit der entsprechenden Menge an zehnfach konzentriertem Ligations-Puffer, der zusammen mit der Ligase geliefert wird, und 1 Unit T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde mind. 4 Stunden meist aber über Nacht bei 16 °C inkubiert und konnte direkt für die Transformation verwendet werden.

2.8 Transformation von Bakterienzellen

Zur Transformation von Bakterienzellen wurden drei Methoden angewendet: die CaCl_2 -Methode, die Elektroporation und der konjugative Transfer. Während die CaCl_2 -Methode standardmäßig zum Transfer von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen eingesetzt wurde, wurden *P. putida*-Zellen durch Elektroporation oder Konjugation transformiert, da sich diese Zellen nur sehr schlecht für die CaCl_2 -Methode eignen. Unter bestimmten Bedingungen erwies sich die Konjugation als die effektivste Methode für *P. putida*. Die Transformationseffizienz der Elektroporation lag für *E. coli*-Zellen (DH5 α) bei 10^9 - 10^{10} Transformanden pro μg pBR322 Plasmid-DNA. Sie liegt damit mind. eine Zehnerpotenz höher als die klassische CaCl_2 -Transformation und wurde angewandt, wenn die Transformationsrate aufgrund des verwendeten Plasmids oder des Bakterienstammes gering war.

2.8.1 CaCl_2 -Methode

100 ml LB Medium wurden mit 200 μl einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 kultiviert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis bzw. mit Eis vorgekühlten Lösungen und Gefäßen durchgeführt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall GS3-Rotor, 4000 Upm, 5 min, 4 °C), schonend in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung aufgenommen, 20 Minuten auf Eis belassen, dann erneut abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 4000 Upm, 10 min, 4 °C) und schließlich in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden dann 200 μl Aliquots direkt zur Transformation verwendet.

Zur längerfristigen Lagerung der kompetenten Zellen wurden 2 ml der in CaCl_2 resuspendierten Zellen mit 70 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) gemischt, und erneut 15 min auf Eis belassen, bevor weitere 70 μl DMSO zugegeben wurden. Nach weiteren 15 min auf Eis wurden die kompetenten Zellen in 200 μl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 μl frisch hergestellte oder langsam auf Eis aufgetaute Zellen der zuvor bei -70 °C gelagerten kompetenten Zellen mit 1-500 ng Plasmid-DNA bzw. 2-6 μl Ligationsansatz gemischt. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden. Um die Expression der zur Selektion von Transformanden dienenden Markergene der transferierten DNA zu ermöglichen, wurden die Transformationsansätze vor dem Ausplattieren auf einer Selektionsplatte jeweils mit 800 μl SOC-Medium (s. 2.3.1) bei 37 °C auf dem Schüttler für eine Stunde inkubiert.

2.8.2 Elektroporation

Zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Elektroporation wurde für *E. coli*- und *P. putida*-Zellen dasselbe Protokoll angewendet. Für jeden Elektroporationsversuch wurden 20

ml LB-Medium mit einer frischen Vorkultur beimpft. Bei einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,6-0,8$ wurden die Zellen abzentrifugiert (Sorvall SS34-Rotor, 15 min bei 6500 Upm, 4 °C) und mit einem gleichen Vol eiskaltes, steriles Milli-Q-Wasser gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren (s. o.) in 1/2 Vol Wasser aufgenommen. Abschließend wurden die Zellen wieder pelletiert und in 200 µl Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden für jede Elektroporation frisch angesetzt, wobei immer auf Eis gearbeitet wurde.

Für die Elektroporation wurden 200 µl elektrokompetente Zellen mit ca. 20-500 ng Plasmid-DNA bzw. 1 µl Ligationsansatz versetzt und in sterile, bei -20 °C vorgekühlte Elektroporationsküvetten (0,1cm Spaltbreite) pipettiert. Die Elektroporation wurde bei 1,7 kV (17 kV/cm), 25 µF und 200 Ohm mit einem "Gene Pulser" der Firma Bio-Rad durchgeführt, wobei die Zeitkonstante zwischen 4,5-5 liegen sollte. Der Ansatz wurde anschließend mit 800 µl SOC-Medium gemischt, für 1 h bei 30 °C (für *P. putida*) bzw. 37 °C (für *E. coli*) auf dem Schüttler inkubiert und dann auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

2.8.3 Konjugativer Transfer von Plasmiden (Mating)

Bei diesem Verfahren wird der Donorstamm in physischen Kontakt mit dem Rezipientenstamm gebracht, wobei durch Konjugation das Plasmid des Donors in den Rezipienten übertragen wird. In dieser Arbeit wurden Matings immer mit dem Helferstamm HB101 (pRK600) durchgeführt, der die zum konjugativen Transfer notwendigen *mob* und *tra* Gene lieferte (triparentales mating). Angewendet wurde diese Methode in Fällen, wo ein Plasmidtransfer durch Elektroporation oder mit der $CaCl_2$ -Methode ineffektiv gewesen wäre.

Übernachtskulturen des Donor-, Rezipienten- und Helferstammes wurden in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Jeweils 1 ml der Kulturen wurde abzentrifugiert (3 min bei 8000 Upm und RT) und zweimal mit 1 ml LB-Medium gewaschen (jeweils wieder 3 min bei 8000 Upm und RT zentrifugiert), um eventuell noch vorhandene Antibiotikareste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellpellets in 200 µl LB-Medium resuspendiert und jeweils 50 µl dieser drei Zellsuspensionen wurden in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Das Gemisch wurde dann auf eine sterile Membran (Millipore HAWPO2500, 0,45 µm, Ø = 25 mm) pipettiert, die ÜN auf einer LB-Platte ohne Antibiotika bei 30 °C inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran mit den gewachsenen Zellen in ein 15 ml Plastik-Röhrchen (Greiner) überführt, in das dann 2 ml einer sterilen 0,85%igen (w/v) NaCl-Lösung gefüllt wurden. Durch starkes Schütteln wurden die Zellen von der Membran gewaschen und geeignete Mengen dieser Zellsuspension wurden auf Agarplatten mit Selektiv- oder Minimalmedium ausplattiert, die dann bei 30 °C oder 37 °C je nach Rezipienten-Stamm zur Selektion der Exkonjuganden-Kolonien bebrütet wurden.

2.9 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen

Eine wässrige Lösung doppelsträngiger DNA mit einer Konzentration von 50 µg/ml hat bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm eine Absorption von etwa 1,0. Über diese Beziehung wurden die Konzentrationen von DNA-Lösungen bestimmt. Dazu wurden jeweils 6 µl DNA-Lösung in 600 µl Milli-Q-Wasser gelöst und es wurde die Absorption bei 260 nm in Quarzküvetten bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, da das Verhältnis A260/A280 ein Maß für die Reinheit der DNA ist. Liegt das Verhältnis zwischen 1,7 und 1,9 handelt es sich um für die meisten DNA-Manipulationen geeignete, ausreichend reine DNA-Lösungen. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, wohingegen höhere Werte auf einen hohen Anteil an Nukleotiden zurückzuführen sind.

2.10 PCR

Die PCR („polymerase chain reaction“) ist eine einfache Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Dabei hybridisieren zwei Primer jeweils auf dem (+)- bzw. (-)-Strang spezifisch auf ihre komplementären Zielsequenzen. Durch die zyklische Aneinanderreihung verschiedener Temperaturschritte (Denaturierung, Annealing, Polymerisation) amplifiziert eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. *Taq*-Polymerase) in Anwesenheit von dNTPs den Sequenzbereich zwischen den beiden Primern. Die optimale Annealing-Temperatur ergibt sich aus der primerspezifischen Schmelztemperatur (T_m) abzüglich 5 °C nach der Formel $T_m = (G+C) \cdot 4 + (A+T) \cdot 2$.

Mit dem folgenden allgemeinen Ansatz wurden analytische PCR-Reaktionen und auch Reaktionen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung in Vektoren durchgeführt:

- Template-DNA der Konzentration 0,1 µg/µl	1,0 µl
- 10 × Taq-Puffer (Boehringer Mannheim)	5,0 µl
- dNTP-Mix (je 2,5 mM pro dNTP)	4,0 µl
- Primer A (10 pmol/µl)	2,5 µl
- Primer B (10 pmol/µl)	2,5 µl
- <i>Taq</i> -Polymerase (Boehringer Mannheim),	0,3 µl (=1,5 Units)
- steriles Milli-Q-H ₂ O	34,7 µl

Gesamtvolumen = 50,0 µl

Als Template diente neben reiner, isolierter DNA auch ein Lysat aus ganzen Bakterienzellen. Hierzu wurde mit einem sterilen Holzzahnstocher wenig Zellmaterial einer Bakterienkolonie in 15 µl steriles Milli-Q-Wasser gelöst und die Suspension wurde dann für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die so lysierten Bakterien wurden kurz abzentrifugiert (Heraeus-Tischzentrifuge, 3 min bei 13.000 Upm) und 1-3 µl des Überstandes wurden in der PCR verwendet.

Der Ansatz wurde gemischt, kurz abzentrifugiert und mit ca. 30 µl Mineralöl (Bayol F, Serva) überschichtet. Die PCR-Reaktion wurde in einem programmierbaren Thermocycler (s. 2.1) mit folgendem Programm durchgeführt (die Temperaturwechsel erfolgten jeweils mit größtmöglicher Geschwindigkeit):

- A) 1 Zyklus: 95 °C/120 sec (vollständige Denaturierung)
- B) 35 Zyklen: $\left[\begin{array}{ll} 1. & 95\text{ °C}/30\text{ sec} & (\text{Denaturierung}) \\ 2. & 40\text{-}60\text{ °C}/30\text{ sec} & (\text{Primer-Annealing, Inkrement pro Zyklus: 3 sec}) \\ 3. & 72\text{ °C}/60\text{ sec} & (\text{DNA-Synthese, Inkrement pro Zyklus: 3 sec}) \end{array} \right.$
- C) 1 Zyklus: 72 °C/600 sec (Abschluß der letzten Reaktion)
- D) bis zur Entnahme: 4 °C

Nach der Reaktion wurden die Proben kurz bei -20 °C eingefroren, um das noch flüssige Mineralöl besser abpipettieren zu können. Zur Analyse der PCR-Produkte wurde eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.7.6) durchgeführt. Je 2-3 µl des PCR-Ansatzes wurden pro Geltasche aufgetragen.

Folgende Primer wurden in dieser Arbeit für die PCR verwendet:

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotid-Primer (Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen und bezeichnet.)

Name	Sequenz (5' → 3')	T _a [°C]
PRHU1	AGCGATCTTGATCGGCTTGC	57
PLHU2	TGAACAAGTCGGAAGTATGATCG	57
PLHIMA	AACGCCATGGGTGCTCTGACGAAAGC <i>NcoI</i>	61*
PRHIMA	GCAGGGATCCGTTATGGCTTGGTTCC <i>BamHI</i>	47*
PLHIP3	AAGGGAAACATATGACGAAGTCGGAGC <i>NdeI</i>	49*
PRHIP2	AGCCGGATCCAATCAGGTGTGGGCCTC <i>BamHI</i>	49*
PLKB1	GGAATTCACGTGCCGATGTGGCCATGACCGGCG <i>EcoRI</i>	83*

PRKB2	TCAGGATCCTTAAGTATGTAATGAAAAGCTTATGAAACGTGTGC <i>Bam</i> HI	87*
PLKB3	TAAGGATCCTGACAAACCGGCAAGGCAATCAAGATCGAAGCC <i>Bam</i> HI	95*
PRKB4	ACGTAAGCTTGCATCAGTTGACGGCGCTGCATGTCGGC <i>Hind</i> III	87*
PLKN1	GGAATTCTCGGCGCGCTGCAAAAGTTGC <i>Eco</i> RI	63*
PRKN2	TCAGGATCCTTAATCAAATTCGATGGTTATGCAGCGGACTACG <i>Bam</i> HI	91*
PLKN3	TAAGGATCCTGAGACCAACTGATTGCCGACATCGCCGAATCG <i>Bam</i> HI	97*
PRKN4	ACGTAAGCTTCCCGGGCAAGCCGGGCGCGGTTTCG <i>Hind</i> III	85*
PLKOB5	GCCATGCCTCCCAGCACACG	63
PRKOB7	GCGTCCTGGCTATGAGTGGC	61
PLKON5	CGATAACGTCGTAGTCCGCTGC	65
PRKON6	GTCAGCACTTTGGCTGGAACGAAC	69
PLNAK5	CCGATAACGTCGTAGTCC	51
PRNAK6	GCGGTTTCGTCAAAGCAAC	53

* Die Annealing-Temperaturen beziehen sich auf den Teil der Oligonukleotide, der auch auf der Template-DNA hybridisiert. Allerdings ist die zur Berechnung von T_a verwendete Faustformel nur für Oligonukleotide von bis zu ca. 30 b geeignet. Die berechnete T_a von längeren Primern ist daher ungenau und wurde hier nur verwendet, um zu überprüfen, ob T_a deutlich über 60 °C (der höchsten in der PCR angewendeten Annealing-Temperatur) liegt.

2.11 DNA-DNA-Hybridisierung

Durch DNA-DNA-Hybridisierungstechniken ist es möglich, mit Hilfe von markierten Gensonden homologe Gene im Genom eines Organismus nachzuweisen. Unter geeigneten (weniger stringenten) Bedingungen können auch weniger homologe Sequenzen detektiert werden. Es bildet jeweils eine markierte, einzelsträngige Gensonde mit komplementären Sequenzen im Genom Basenpaarungen aus, was zur Bildung einer markierten Heteroduplex-DNA führt. In der Regel müssen die Sequenzen zu mindestens zwei Dritteln homolog sein, um sich solcherart mit Gensonden nachweisen lassen.

DNA-DNA-Hybridisierungsmethoden können auch genutzt werden, um Restriktionsfragmente, die das gesuchte Gen bzw. die gesuchte Region enthalten, zu identifizieren. Diese Fragmente können anschließend kloniert und sequenziert werden. Um ein Gen auf einem Restriktionsfragment nachzuweisen, wird zunächst eine Digoxigenin-markierte DNA-Sonde mittels PCR hergestellt. Ein Verdau von chromosomaler DNA mit jeweils verschiedenen Restriktionsenzymen wird in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran übertragen. Unter weniger stringenten Bedingungen bringt man dann die

markierte Sonde mit der DNA auf der Nylonmembran in Kontakt wobei die Sonde mit zu ihr homologen Sequenzen, wenn vorhanden, hybridisiert. In der darauffolgenden immunologischen Detektion der markierten Sonde kann die Größe des Restriktionsfragments abgeschätzt werden, mit dem die Sonde hybridisierte.

Für die Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden und die immunologische Detektion wurde das "DIG DNA Labeling and Detection Kit" (Nr.: 1093657, Boehringer Mannheim) verwendet. Die im Folgenden aufgeführten Methoden sind detailliert in der Broschüre "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Boehringer Mannheim, 1995) beschrieben und werden hier deshalb nur kurz zusammengefaßt.

2.11.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Gensonden mittels PCR

Die Verwendung von logarithmischer PCR (s. 2.10) zur Herstellung von markierten Sonden hat im Gegensatz zu anderen Methoden (z.B. "random primed", siehe "DIG DNA Labeling and Detection Kit") den Vorteil, daß sehr effektiv Sonden in großer Zahl synthetisiert werden, die in ihrer Nukleotidsequenz identisch (bei Vernachlässigung der Fehlerrate der *Taq*-Polymerase) und alle gleich lang sind.

Das für die Sondensynthese verwendete Markierungsgemisch enthält neben dem unmarkierten dATP, dCTP, dGTP und dTTP auch Digoxigenin-11-dUTP. Mit dem folgenden PCR-Ansatz wurden DIG-markierte DNA-Sonden hergestellt:

- Template-DNA (0,1 mg/ml)	1,0 µl
- 10 × <i>Taq</i> -Puffer (Boehringer Mannheim)	5,0 µl
- dNTP-Markierungsgemisch (Boehringer Mannheim, Nr.: 1277065)	10,0 µl
- Primer A (10 pmol/µl)	2,5 µl
- Primer B (10 pmol/µl)	2,5 µl
- <i>Taq</i> -Polymerase (Boehringer Mannheim)	0,3 µl (= 1,5 Units)
- H ₂ O	28,7 µl

Gesamtvolumen = 50,0 µl

Die Durchführung der PCR erfolgte wie unter 2.10 beschrieben. Anschließend wurde die markierte DNA durch eine Ethanolpräzipitation (s. 2.7.5) gereinigt, wobei allerdings eine 4 M Lithiumchlorid-Lösung anstelle der 3 M Na-Acetat-Lösung verwendet wurde. Schließlich wurde die Sonde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Zur Abschätzung, wie effektiv die Markierung verlief und wieviel von der Sonde für eine Hybridisierung eingesetzt werden soll, wurde eine immunologische Detektion der auf einer positiv geladenen Nylonmembran (Pall) in verschiedenen Konzentrationen aufgetragenen, fixierten Sonde durchgeführt. Als Standard wurde zum Vergleich

Digoxigenin-markierte Kontroll-DNA (Boehringer Mannheim, "DIG DNA Labeling and Detection Kit") ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen.

2.11.2 Southern-Blotting

Zunächst wird die zu untersuchende DNA (z. B. chromosomale DNA) durch Restriktionsverdau (s. 2.7.8.1) vollständig fragmentiert und durch eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.7.6) nach der Größe aufgetrennt. Anschließend erfolgt der Transfer der DNA aus dem Gel auf eine Membran (Southern-Blotting).

Die mit Restriktionsendonukleasen geschnittene bakterielle DNA wurde 3 min bei 56 °C im Thermoblock (s. 2.1) erhitzt, um die kohäsiven Enden zu trennen. In die Geltaschen eines 0,8%igen Agarosegels wurden dann je 6 µg der verdauten DNA und in den äußeren Taschen 3 µl der Digoxigenin-markierten Molekulargewichtsmarker II und VI (Boehringer Mannheim) aufgetragen. Das Gel wurde in TAE-Puffer bei 20-30 V in einer großen Elektrophorese-kammer (Horizon 11-14) über Nacht laufen gelassen, dann mit Ethidiumbromid angefärbt und schließlich fotografiert, um die korrekte Auftrennung zu kontrollieren. Anschließend wurde die DNA depuriniert, indem das Gel 10 min in 0,2 N HCl vorsichtig geschüttelt wurde. Nach kurzem Waschen in sterilem Milli-Q-H₂O wurde das Gel zweimal für 20 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 N NaOH) und nach einem weiteren Wasch-Schritt in Milli-Q-H₂O zum Neutralisieren zweimal für 15 min in steriler Neutralisierungslösung (1 M Tris · HCl, pH 7,5; 1,5 M NaCl) geschwenkt.

Das Blotting wurde mit Hilfe eines "Posiblot 30-30 Pressure Blotter" (s. 2.1) durchgeführt: hierbei wird die DNA aus dem Gel mit dem Strom des Transferpuffers auf eine positiv geladene Nylonmembran (Fa. Pall) übertragen. Der Aufbau der Apparatur sowie die Durchführung des Blotting wurde wie in der dem Gerät beigelegten Anleitung beschrieben ausgeführt. Als Transferpuffer wurde 20 × SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Na₃-Citrat, auf pH 7,0 mit HCl) verwendet und der Transfer dauerte ca. 90 min. Um zu kontrollieren, ob die DNA-Banden durch das Blotting aus dem Gel entfernt wurden, wurde nach dem Transfer das Gel noch einmal mit Ethidiumbromid angefärbt und fotografiert.

Die feuchte Membran wurde 50 sec mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt, um die übertragenen DNA-Fragmente auf der Membran zu fixieren. Der hierfür verwendete UV-Crosslinker (s. 2.1) besitzt mit der "auto-crosslink"-Funktion ein speziell für diesen Zweck optimiertes Programm.

2.11.3 Sondenhybridisierung

Die Membran wurde in einen handelsüblichen Plastikbeutel mit 40 ml Standard-Hybridisierungslösung (5 × SSC (s. 2.11.2), 0,10 % (w/v) N-Lauroylsarkosin, 0,02 % (w/v) SDS, 1 % Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim)) luftblasenfrei eingeschweißt. Während einer 1-stündigen Prähybridisierung bei 60 °C zur Verhinderung späterer

unspezifischer Hybridisierung wurde der Beutel dann in einer Plastikschiessel mit Wasser im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus dem Plastikbeutel entfernt, durch 7 ml Standard-Hybridisierungslösung mit ca. 25 ng frisch denaturierter DNA-Sonde ersetzt, und dann wurde der Beutel erneut verschweißt. Zur Denaturierung war die Sonde zuvor 10 min bei 95 °C erhitzt und dann ca. 5 min auf Eis gestellt worden. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht bei 60-68 °C.

Am nächsten Tag wurde die Membran bei RT zweimal 5 min in $2 \times \text{SSC}$ mit 0,1 % (w/v) SDS unter Schütteln gewaschen. Die dann folgenden zwei Wasch-Schritte in $0,1 \times \text{SSC}$ mit 0,1 % (w/v) SDS für je 15 min bestimmen die Stringenz der Hybridisierung durch die Wahl einer geeigneten Temperatur zwischen 40 und 68 °C: mit Erhöhung der Temperatur wird die Stringenz der Hybridisierungsreaktion erhöht, da zunehmend höhere Homologien zwischen Sonde und DNA-Fragmenten für eine Hybridisierung erforderlich sind.

2.11.4 Immunologische Detektion von markierten DNA-Sonden

Die Durchführung der Detektion erfolgte nach dem Protokoll in der Broschüre "The DIG System User's Guide for Filter Hybridization" (Boehringer Mannheim, 1995). Hierbei wird zunächst ein Anti-Digoxigenin-Antikörper auf die Membran gegeben. Dieser an Digoxigenin-markierte Sonden bindende Antikörper ist an eine alkalische Phosphatase konjugiert. Das Substrat der Antikörper-gebundenen alkalischen Phosphatase ist das Lumigen-PPD (4-Methoxy-4-(3-phosphat-phenyl)-spiro(1,2-dioxetan-3,2'-adamantan)-Dinatriumsalz). Die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit dem Lumigen-PPD resultiert in der Emission von Licht, das hochempfindliche Filme schwärzen kann. Zur Belichtung wurde ein Film (XAR 5, Kodak) für 4 bis 12 Stunden in einer Filmkassette auf die Membran gelegt und die anschließende Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe einer Entwicklungsmaschine (s. 2.1).

2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Taq Cycle Sequencing-Methode, die im Prinzip auf der klassischen Methode nach Sanger *et al.* (1977) beruht. Hierbei synthetisiert eine Taq-Polymerase DNA-Fragmente wiederholt an demselben Template, wobei jeweils basenspezifisch verschieden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (Dye-Terminatoren) die Strangbildung terminieren und gleichzeitig die Stränge endmarkieren. Die Reaktionsgemische werden anschließend in einer Elektrophorese aufgetrennt. Ein Laser regt dann die verschiedenen markierten DNA-Fragmente an und mißt die vier unterschiedlichen Fluoreszenzen der Terminatoren. Durchgeführt wurden Elektrophorese und Detektion in einem Sequenziersystem der Fa. Applied Biosystems (s. 2.1) von dem Sequenzierungsservice des Bereichs Mikrobiologie der GBF.

2.12.1 Dye-Terminator Cycle Sequencing mittels PCR

Der im Reaktionsansatz verwendete Premix ist Bestandteil des "PRISMTM Ready Reaction DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kits" (Applied Biosystems) und besteht aus Reaktionspuffer, dNTP-Mix, DyeDeoxy NTPs und AmpliTaq DNA-Polymerase. Somit ergab sich für den Reaktionsansatz folgende Zusammensetzung:

- Premix	8,0 µl
- Template-DNA	ca. 1,0 µg
- Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
- Milli-Q-H ₂ O	ad 20 µl

Die PCR-Reaktion wurde in einem programmierbaren Perkin Elmer-Thermocycler (s. 2.1) durchgeführt, bei dem die Verwendung von Mineralöl nicht mehr notwendig war. Das Programm hatte folgende Struktur:

A) 25 Zyklen	1.	95 °C/15 sec	(Denaturierung)
	2.	50-60 °C/15 sec	(Primer-Annealing)
	3.	60 °C/240 sec	(Synthese markierter Fragmente)
B) bis zur Entnahme: 4 °C			

2.12.2 Aufbereitung der Reaktionsansätze für die Sequenzierung

Die PCR-Ansätze wurden mit 2 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) und 50 µl absolutem Ethanol (RT) versetzt, gemischt und dann 20 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen und nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 14.000 Upm wurde das Ethanol entfernt. Schließlich wurde das Pellet in der Vakuumzentrifuge für 3 min getrocknet. Bis zur Weiterverwendung wurden die Sequenzierungsreaktionen bei -20 °C gelagert und kurz vor der Auftragung auf das Sequenziergel in 3 µl einer Formamid : EDTA-Lösung (Formamid : 50 mM EDTA (pH8,0), 5 : 1) gelöst.

2.12.3 Auswertung der Sequenzdaten

Die vom Sequenziersystem erhaltenen Elektropherogramme, welche die Signalstärken der einzelnen detektierten Basen darstellen, wurden mit der ABI PRISMTM DNA Sequencing Software (s. 2.16) analysiert und ausgewertet. Die Sequenzdaten konnten als Textdateien in Programme zur Darstellung und Editierung von Nukleinsäuresequenzen importiert werden.

2.13 Proteinaufreinigung

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene Proteine aufgereinigt: HupB, HupN, IHF, Sigma-54 (σ^{54}) und RNA-Polymerase (Core-Enzym). Da sich die Protokolle der Reinigung für die einzelnen Proteine unterscheiden, werden in diesem Kapitel, der Übersichtlichkeit wegen, zunächst die Schritte von der Zellanzucht bis zur Ammoniumsulfat-Präzipitation für jedes Protein getrennt dargestellt. Dagegen werden anschließend in Kapitel 2.13.2 die chromatographischen Methoden nur allgemein beschrieben. Die Methoden zur Konzentrierung und Lagerung der aufgereinigten Proteine sind in Kapitel 2.13.3 aufgeführt. Die Durchführung der Arbeiten zur Proteinaufreinigung erfolgte generell bei 6 °C im Kühlraum oder auf Eis. Die verwendeten Lösungen wurden entsprechend vorgekühlt.

2.13.1 Anzucht und Aufarbeitung der Zellen für die Säulenchromatographie

2.13.1.1 Protokoll für HupB, HupN und IHF

Das hier beschriebene Verfahren basiert auf die von Padas *et al.* (1992) verwendete Methode zur Aufreinigung von HU aus *Bacillus*. Aufgrund der sehr ähnlichen biochemischen Eigenschaften von HU und IHF wurde dieses Protokoll in dieser Arbeit auch zur Reinigung von *P. putida*-IHF verwendet.

4-5 L LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit 1/50 Vol einer entsprechenden ÜN-Kultur (Stämme s. 3.2 bzw. 3.3) angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ bei geeigneter Temperatur (s. 2.5) inkubiert. Durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1-2 mM wurde die Überexpression der zur Proteinsynthese klonierten Gene induziert. Nach einer weiteren Inkubation für 3-4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 10 min bei 10000 Upm und 4 °C) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C eingefroren. Dann wurden die Zellen in Puffer A (25 mM Tris · HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 3 mM β -Mercaptoethanol, 100 mM NaCl) resuspendiert, und zwar in 3 ml Puffer A pro 1 g Zellen (Naßgewicht). Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Hilfe einer French Press bei einem Druck von 20000 psi nach dem Protokoll des Herstellers aufgeschlossen, und der Extrakt wurde anschließend abzentrifugiert (Sorvall SS-34-Rotor, 30 min bei 17000 Upm und 4 °C). Der nun klare Extrakt wurde dann einer 2-stufigen Ammoniumsulfat-Präzipitation unterzogen: in der 1. Stufe wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat (0,334 g pro ml Extrakt, Zugabe schrittweise innerhalb von 10 min) unter Rühren die Sättigung im Extrakt langsam auf 55 % erhöht. Die Lösung wurde noch 20 min weiter gerührt und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wurde dann mit Ammoniumsulfat auf 85 % Sättigung gebracht, indem innerhalb von 10 min die Konzentration auf 0,564 g pro ml Extrakt erhöht wurde. Nach weiteren 20 min unter

Rühren wurde dann die Lösung wie oben abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml Puffer A pro g Zellen (bezogen auf das ursprüngliche Naßgewicht) resuspendiert. Schließlich wurde die Lösung in Dialyseschläuche (Spectra/Por, Porengröße 2000 Da, Spectrum) pipettiert und ÜN gegen 5 l Puffer A dialysiert. Im Anschluß an diese Aufarbeitung wurden eine Heparin- sowie ggf. eine SP-Sepharose-Chromatographie durchgeführt (s. 2.13.2).

2.13.1.2 Protokoll für σ^{54}

Das Protokoll zur Aufreinigung von σ^{54} von *P. putida* beruht im Wesentlichen auf der von Cannon *et al.* (1996) veröffentlichten Methode zur Reinigung des in *E. coli* überexprimierten σ^{54} -Proteins von *Rhodobacter capsulatus*. In diesem Protokoll wird die Eigenschaft von überexprimierten σ^{54} -Proteinen ausgenutzt, als sog. "inclusion bodies" (Proteinaggregate) hauptsächlich unlöslich in der Zelle vorzuliegen. Die "inclusion bodies" sind leicht zu isolieren und können durch Denaturierung und anschließender Renaturierung in lösliches, aktives σ^{54} -Protein überführt werden. In einer nachfolgenden Heparin-Chromatographie werden dann die korrekt gefalteten und deshalb aktiven σ^{54} -Proteine von den falsch gefalteten, inaktiven getrennt.

3 l LB-Medium mit 150 µg/ml Ampicillin wurden mit 1/50 Vol einer ÜN-Kultur von *E. coli* TH1 (pFBT19) angeimpft und 2 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert, so daß eine OD₆₀₀ von ca. 1 erreicht wurde. Nach Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) zur Induktion der Überexpression des für σ^{54} codierenden *rpoN*-Gens wurde die Kultur noch weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (Sorvall GSA-Rotor, 15 min bei 8000 Upm und 4 °C) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Nachdem die Zellen (Naßgewicht ca. 12 g) wieder aufgetaut waren, wurden sie in 50 ml TGEMN-Puffer (50 mM Tris · HCl (pH 8,0), 5 % (v/v) Glycerin, 0,1 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, 50 mM NaCl) resuspendiert und mit Hilfe einer French Press bei 20000 psi entsprechend der Herstellerangaben aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation (Sorvall SS-34-Rotor, 20 min bei 10000 Upm und 4 °C) befand sich der Hauptteil des σ^{54} -Proteins als unlösliche Aggregate ("inclusion bodies") im Pellet. Dieses wurde dann in TGEMN-Puffer mit 0,5 % (w/v) Triton X-100 und 10 mM EDTA resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde das Pellet zweimal in TGEMN-Puffer gewaschen und wie oben zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das gewaschene Pellet in 36 ml (3 ml pro 1 g Zellen) TGEMN-Puffer mit 8 M Harnstoff gelöst, wobei das gesamte Protein denaturierte. Nach erneuter Zentrifugation (s. oben) wurde der Überstand mit dem nun löslichen Protein in einen Dialyseschlauch (Porengröße 10 kDa) gefüllt und gegen 5 l TGEMN-Puffer mit 250 mM NaCl ÜN dialysiert. Anschließend wurde wiederum gegen 5 l TGEMN-Puffer mit 100 mM NaCl ÜN dialysiert, und am nächsten Tag wurde das renaturierte und jetzt lösliche σ^{54} -Protein von wieder ausgefälltem Protein durch Zentrifugation (Sorvall SS-34-Rotor, 20 min bei 12000 Upm und 4 °C) gereinigt.

Zur weiteren Reinigung wurden im Anschluß an diese Aufarbeitung eine Heparin-, SP-Sepharose- und Q-Sepharose-Chromatographie durchgeführt (s. 2.13.2).

2.13.1.3 Protokoll für RNA-Polymerase (Core-Enzym)

Das hier verwendete Protokoll zur Reinigung des RNA-Polymerase-Core-Enzyms aus *P. putida* basiert sowohl auf die von Burgess & Jendrisak (1975) und Fujita & Amemura (1992) veröffentlichten Methoden zur Aufreinigung der RNA-Polymerase aus *E. coli* als auch auf den von Wellington & Spiegelman (1991) beschriebenen Einsatz von Heparin-Sepharose zur Trennung des RNA-Polymerase-Holoenzym vom Core-Enzym. Die Verwendung von Polymyxin P, einem Polyethylenimin, geht auf Burgess & Jendrisak (1975) zurück und bewirkt das Ausfällen von sauren Molekülen (z. B. Nukleinsäuren, Nukleoproteinen, wie Chromatin und Ribosomen, und sauren Proteinen, wie RNA-Polymerasen) aus Proteinextrakten. Da die RNA-Polymerase aus dem *P. putida*-Wildtyp aufgereinigt wurde, d. h. ohne Überexpression der einzelnen Gene, war die Verwendung von Polymyxin P notwendig, weil auf diese Weise die RNA-Polymerase angereichert werden konnte.

In einem Fermenter (New Brunswick, 20 l Vol) wurden 12 l LB-Medium ohne Antibiotika mit 1/50 Vol ÜN-Kultur (mit 50 µg/ml Rifampicin) von *P. putida* KT2442 angeimpft und aerob bei 30 °C für ca. 6 h bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 2 bebrütet. Die Zellen wurden durch Abfiltrieren geerntet und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die 94 g Zellen (Naßgewicht) in 300 ml PB-Puffer (20 mM Tris · HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol, 5 % (v/v) Glycerin) mit 0,1 M NaCl resuspendiert und bei 20000 psi mit einer French Press nach der Vorschrift des Herstellers aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation (Sorvall GSA-Rotor, 40 min bei 13000 Upm und 4 °C) wurde der Überstand mit PB-Puffer mit 0,1 M NaCl soweit verdünnt, bis der Gesamtproteingehalt 10 mg/ml betrug. Unter Rühren wurden dann 12,5 ml einer 10%igen (w/v) Polymyxin P-Lösung hinzugegeben. Zur Herstellung der 10%igen (w/v) Polymyxin P-Lösung wurde eine 50%ige (w/v) Polymyxin P-Lösung (Sigma) mit Milli-Q-H₂O auf 10 % verdünnt, mit konz. HCl auf pH 8,0 eingestellt und dann filtriert. Nach der Zugabe von Polymyxin P wurde der Extrakt noch 15 min weitergerührt und danach abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 25 min bei 8000 Upm und 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pasten-ähnliche Pellet wurde mit Hilfe von Mörser und Pistill in 1000 ml PB-Puffer mit 0,3 M NaCl gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (s. oben) wurde das Pellet wieder unter Zuhilfenahme von Mörser und Pistill in PB-Puffer mit 1,0 M NaCl gelöst. Bei diesem Schritt wird die vorher durch Polymyxin P präzipitierte RNA-Polymerase in Lösung gebracht. Als nächstes wurde eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung durchgeführt, indem zunächst zu den 980 ml NaCl-Eluat unter Rühren langsam 161 g festes Ammoniumsulfat (entspricht ca. 30 % Sättigung) gegeben wurden. Nachdem die Lösung weitere 2 h gerührt und anschließend abzentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor, 40 min bei 10000 Upm und 4 °C) wurde, wurden langsam nochmals 193 g Ammoniumsulfat unter Rühren zum

Überstand gegeben (entspricht ca. 60 % Sättigung). Nach 1,5 h unter Rühren wurde die Lösung wie oben abzentrifugiert und das Pellet danach in 100 ml PB-Puffer mit 0,1 M NaCl resuspendiert. Die Lösung wurde dann in Dialyseschläuche (Porengröße 10 kDa) gefüllt und zweimal gegen 5 l PB-Puffer mit 0,1 M NaCl ÜN dialysiert.

An diese Aufarbeitung schloß sich zur weiteren Reinigung des RNA-Polymerase-Core-Enzyms eine DEAE-Sephacel-, Heparin-Sepharose-, Q-Sepharose- und Phosphocellulose-Chromatographie (s. 2.13.2) an.

2.13.2 Chromatographische Methoden zur Proteinaufreinigung

Die Säulenchromatographie wurde mit Hilfe eines FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)-Geräts (s. 2.1) sowie mit einem einfacheren System bestehend aus Pumpe, Programmierereinheit, UV-Detektor, Schreiber und Fraktionssammler (Pharmacia) durchgeführt. Die Trennung der Proteine sowie ihre relative Konzentration wurde während der Chromatographie in der Durchflußzelle des UV-Detektors bei 280 nm verfolgt. Die Geräte waren entweder im Kühlraum bei 6 °C oder in einem speziell für diesen Zweck eingerichteten Kühlschrank (4 °C) untergebracht. Die Fließmittel wurden unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und dabei gleichzeitig entgast. Proteinlösungen wurden vor der Trennung mit Hilfe einer Spritze ebenfalls sterilfiltriert. Die Durchführung der Säulenchromatographie sowie die Programmierung der Puffergradienten erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die eluierten Proteine wurden in Fraktionen geeigneter Größe (1-4 ml) aufgefangen, welche anschließend durch SDS-PAGE (s. 2.13.5) analysiert wurden. Fraktionen mit der höchsten Reinheit wurden dann vereinigt und für den folgenden Reinigungsschritt eingesetzt.

Die verwendeten Affinitätschromatographie- und Ionenaustauscher-Säulen wurden ausnahmslos von Hand gepackt, indem leere Econo-Säulen verschiedener Größe mit entsprechenden Adaptoren (Bio-Rad) mit dem geeigneten Säulenmaterial (s. 2.13.2.1 und 2.13.2.2) gefüllt wurden.

2.13.2.1 Heparin-Affinitätschromatographie

Heparin ist ein negativ geladenes Glycosaminoglycan und ist durch seine strukturelle Ähnlichkeit zu DNA sehr gut zur Reinigung von Proteinen geeignet, die mit DNA oder RNA interagieren. Als Säulenmaterial wurde Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia) verwendet, das entsprechend den Herstellerangaben äquilibriert und in Säulen gepackt wurde. Das Säulenvolumen richtete sich nach der theoretischen Bindungskapazität des Heparins sowie nach der erwarteten Menge des aufzureinigenden Proteins im Extrakt bzw. in der Probenlösung. Eine entsprechende Menge der pulverförmigen Heparin-Sepharose wurde abgewogen und mehrmals mit mehrfachen Vol Milli-Q-Wasser gewaschen. Danach wurde die Lösung in eine geeignete Econo-Säule gegossen und nach dem Absetzen der Heparin-

Sephacel wurde die Säule über den an die Pumpe bzw. an die FPLC-Anlage angeschlossenen Adapter mit mehreren Vol Startpuffer äquilibriert. Nachdem dann die Proteinlösung auf die Säule gegeben wurde, wurde solange mit Startpuffer gewaschen, bis kein Protein mehr die Säule verließ. Entsprechend dem Säulenvolumen wurden anschließend ca. 10 Vol Salzgradient (z. B. 0,1 M - 1,0 M NaCl) über die Säule gegeben, indem ein kontinuierlich größer werdendes Mischungsverhältnis von Startpuffer zu Elutionspuffer eingestellt wurde. Durch SDS-PAGE wurden die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, identifiziert. Fraktionen, die dann die geringste Kontamination mit anderen Proteinen aufwiesen, wurden vereinigt und entweder gegen den Startpuffer für die nächste Chromatographie dialysiert oder ultrafiltriert (s. 2.13.3) und anschließend im geeigneten Puffer aufgenommen.

2.13.2.2 Ionenaustauscher-Chromatographie

Bei der Ionenaustauscher-Chromatographie werden geladene Proteine an funktionelle Gruppen des Säulenmaterials gebunden, die dann bei einer höheren spezifischen Salzkonzentration eluiert werden. Als schwacher Anionenaustauscher wurde DEAE-Sephacel oder DEAE-Sephacel (Pharmacia) und als starker Anionenaustauscher wurde Q-Sephacel (Pharmacia) verwendet. Weiterhin wurde als Kationenaustauscher SP-Sephacel (Pharmacia) und Phosphocellulose P11 (Whatman) verwendet. Durchgeführt wurde die Ionenaustauscher-Chromatographie wie die Heparin-Chromatographie (s. 2.13.2.1), allerdings sind die genannten Chromatographiemedien der Firma Pharmacia bereits flüssig und wurden direkt in Econo-Säulen gegossen. Daraufhin wurden die Säulen sofort an eine Pumpe angeschlossen und zunächst mit Milli-Q-Wasser gepackt (doppelte Fließgeschwindigkeit als bei der eigentlichen Chromatographie) und danach zum Laden der Säule mit Gegenionen mit 2 Vol Elutionspuffer gewaschen. Anschließend wurde mit Startpuffer äquilibriert.

Die Phosphocellulose wurde wie vom Hersteller beschrieben zuerst mit 25 Vol 0,5 M NaOH, dann mit 25 Vol 0,5 M HCl behandelt und anschließend so lange mit Startpuffer gewaschen, bis der pH-Wert der Phosphocellulose dem des Startpuffers entsprach. Aufgrund der besonderen Laufbedingungen der Phosphocellulose bei der RNA-Polymerase-Aufreinigung (z. B. sehr geringe Fließgeschwindigkeit) wurde die Chromatographie wie bei Burgess & Travers (1971) beschrieben durchgeführt.

2.13.3 Konzentrierung und Lagerung von Proteinen

Im Anschluß an eine Aufreinigung wurden die Proteine durch Ultrafiltration konzentriert. Hierbei wird eine Proteinlösung durch eine Membran filtriert, die für das zu konzentrierende Protein nicht passierbar ist, wodurch das Volumen des Lösungspuffers reduziert wird. Es wurden verschiedene Konzentratoren der Firma Amicon (Microcon-100, Centricon-10 bzw. 30, Centriprep-10 bzw. 30) nach der Vorschrift des Herstellers verwendet. Nach der

Ultrafiltration wurden die Proteine in Aufreinigungs- bzw. Startpuffer mit 50 % (v/v) Glycerin gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

2.13.4 Bestimmung von Proteingehalten

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen wurde der "Protein Assay" (Bio-Rad) sowie der "Protein Assay ESL" (Boehringer Mannheim) verwendet. Das "Protein Assay" von Bio-Rad basiert auf der Methode von Bradford (1976), wonach die Bindung eines Farbstoffes (Coomassie-Brilliant Blau R-250) an Proteine spektrophotometrisch verfolgt werden kann. In einem Vol von 800 µl wurde die zu bestimmende Proteinlösung mit Milli-Q-Wasser verdünnt und nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz und guter Durchmischung erfolgte nach 10 min Reaktionszeit bei RT die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm. Als Standardprotein diente Rinderserumalbumin (BSA). Da aber, in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz, unterschiedliche Proteine den Farbstoff verschieden stark binden, kommt es zu relativ starken Abweichungen bei der Konzentrationsbestimmung. Deshalb wurde zur exakteren Bestimmung der Proteinkonzentration der "Protein Assay ESL" verwendet, der auf der Methode von Matsushita *et al.* (1993) basiert, welche auf der Komplexbildung von Cu^{2+} -Ionen durch das zu bestimmende Protein beruht. Da die Reaktion nur von der Anzahl der Peptidbindungen abhängig ist, ist diese Methode relativ unabhängig von der Art des zu bestimmenden Proteins. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

2.13.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1. Tris-Glycin-SDS-PAGE

Zur Auftrennung und Reinheitsbestimmung von Proteinen wurde die SDS-PAGE angewendet, welche auf der Wanderung von durch angelagertes SDS (Natriumdodecylsulfat) negativ geladenen denaturierten Proteinen durch ein Polyacrylamidgel bei angelegter Spannung beruht. Hierbei erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Für Proteine im Größenbereich 200-20 kDa wurde eine Tris-Glycin-SDS-PAGE nach dem Protokoll von Laemmli (1970) durchgeführt. Unter Verwendung einer "Mini Protean II Cell" (Bio-Rad) wurde zunächst das Trenngel (10%iges Trenngel: 10 % (w/v) Bis-Acrylamid (Roth), 390 mM Tris · HCl (pH 8,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), 0,04 % (v/v) N, N, N, N - Tetramethylethyldiamin (TEMED)) bis ca. 1,5 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 - 60 min) wurde das Wasser gründlich entfernt und das Trenngel mit dem Sammelgel (5%iges Sammelgel: 5 % (w/v) Bis-Acrylamid, 125 mM Tris · HCl (pH 6,8), 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED) überschichtet. Der Kamm wurde sofort eingesetzt und nach der Polymerisation (ca. 30 min) wieder entfernt, um die Geltaschen mit H_2O zu spülen. Die Gelkammer wurde dann zusammengesetzt und die Pufferreservoirs wurden mit Laufpuffer

(25 mM Tris-Base, 250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt. Zur Vorbereitung der Proben wurden die proteinhaltigen Lösungen mit Ladepuffer (50 mM Tris · HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol) versetzt, wobei beispielsweise zu 10 μ l Proteinlösung 10 μ l 2-fach konz. Ladepuffer gegeben wurden. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend in die Geltaschen geladen. Zunächst wurde solange eine Spannung von 100 V angelegt, bis die Bromphenolblau-Front ins Trenngel gewandert war, danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach ca. 1 -1,5 h wurde der Lauf beendet, wenn die Bromphenolblau-Front aus dem Gel gewandert war.

Gele wurden in Färbelösung (45 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,25 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R250) entweder durch Schütteln für 1 h bei RT oder durch kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C angefärbt. Die Entfärbung erfolgte in der Entfärbelösung (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) in mehreren Schritten bei RT unter Schütteln.

Zur längerfristigen Lagerung der Gele wurden diese zunächst in 8%iger (v/v) Glycerinlösung ÜN geschwenkt und dann zwischen zwei Cellophan-Bogen eingespannt in einem Rahmen (Stratagene) für einige Stunden getrocknet.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der "Broad range molecular weight standard" (Bio-Rad) verwendet. In der folgenden Tabelle sind die Standardproteine des Markers mit ihren Größen aufgeführt:

Tabelle 2.5: Der "Broad range molecular weight standard"

	Name	Größe in kDa
1	Myosin	200
2	β -Galactosidase	116,3
3	Phosphorylase b	97,4
4	Serumalbumin	66,2
5	Ovalbumin	45
6	Carbon-Anhydrase	31
7	Trypsin-Inhibitor	21,5
8	Lysozym	14,4
9	Aprotinin	6,5

2. Tricin-SDS-PAGE

Zur besseren Auftrennung von Proteinen, deren Größe kleiner als 20 kDa ist, wurde das Protokoll von Schägger & von Jagow (1987) verwendet. Hierbei sind die Laufpuffer für Anode und Kathode verschieden: der Kathoden-Puffer (0,1 M Tris-Base, 0,1 M Tricin, 0,1 % (w/v) SDS) enthält gegenüber dem Anoden-Puffer (0,2 M Tris · HCl (pH 8,9)) noch

zusätzlich Tricin und SDS, was die gewünschten Laufeigenschaften bewirkt. Ein 15%iges Trenngel setzte sich zusammen aus 15 % (w/v) Bis-Acrylamid (Roth), 1 M Tris · HCl (pH 8,45), 0,1 % (w/v) SDS, 8,7 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) APS und 0,04 % (v/v) TEMED. Weiterhin setzte sich das 4%ige Sammelgel zusammen aus 4 % (w/v) Bis-Acrylamid, 0,75 M Tris · HCl (pH 8,45), 0,075 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS sowie 0,1 % (v/v) TEMED. Während des gesamten Laufes wurde eine Spannung von konstant 100 V angelegt.

2.13.6 Western Blot für die N-terminale Protein-Sequenzierung

Zur Identifizierung, Analyse und Reinheitsbestimmung von Proteinen wurde die N-terminale Protein-Sequenzierung mittels Edman-Abbau durchgeführt. Es wurde eine Anlage von Applied Biosystems mit Protein-Sequencer, HPLC und Kontrolleinheit verwendet, wobei als Protein-Probe entweder eine entsalzte Proteinlösung oder auf eine PVDF-Membran immobilisiertes Protein eingesetzt wurde. Hierzu wurde aufgereinigtes Protein oder ein Proteingemisch in einer SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend wurde das Gel in Blotting-Puffer (96 mM Tris Base, 78 mM Glycin, 0,074 % (w/v) SDS und 50 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Eine entsprechend große PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) wurde aktiviert, indem sie zunächst für 3 sec in 100 % Methanol, dann 2 min in Milli-Q-Wasser und schließlich einige min in Blotting-Puffer geschwenkt wurde. Der Blot wurde mit Hilfe einer Flüssig-Blot-Apparatur (Bio-Rad) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. In Blotting-Puffer erfolgte der Transfer des Proteins im Gel auf die Membran für ca. 30 min bei einer Spannung von 100 V. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in Milli-Q-Wasser gewaschen und in einer Färbelösung (0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R250, 50 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure) für 1 min angefärbt. Anschließend wurde die Membran für 10 min in 50 % (v/v) Methanol mit 1 % (v/v) Essigsäure entfärbt, zweimal in Milli-Q-Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Schließlich wurden die zu untersuchenden Proteinbanden aus der Membran herausgeschnitten und für die N-terminale Sequenzierung verwendet.

2.14 Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen

2.14.1 Cross-Linking

Mit Hilfe von Cross-Linking läßt sich ermitteln, ob ein Protein als Monomer, Dimer, Trimer, etc. vorliegt. Durch kovalentes Verbinden spezifischer funktioneller Gruppen der einzelnen Untereinheiten wird das Dissoziieren des Proteins in Monomere verhindert. Anhand der

Größe des entstandenen Komplexes, ermittelt durch SDS-PAGE, kann die Anzahl der beteiligten Untereinheiten bestimmt werden. Die für das Cross-Linking verantwortlichen Verbindungsmoleküle (Cross-Linker) besitzen reaktive Gruppen, die mit den funktionellen Gruppen der Proteinuntereinheiten reagieren.

Für das Cross-Linking der HupB- und HupN- Proteine wurde als Cross-Linker DSS (Disuccinimidyl suberate bzw. bis (N-Hydroxysuccinimide ester) bzw. Suberic acid, Sigma) verwendet, das speziell mit Aminogruppen von Lysinresten reagiert. Eine 10 mg/ml DSS-Stocklösung wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Für das Cross-Linking enthielt ein Ansatz von 100 µl: 50 mM Tris · HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 4 µM HupB bzw. HupN, 0,2 mg/ml DSS und Milli-Q-H₂O *ad* 100 µl. Parallele Ansätze enthielten zusätzlich 200 nM Plasmid-DNA (pCB8), um die Multimerisierung in Anwesenheit von DNA zu testen. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit 30 µg/ml Lysozym (Größe: 14,4 kDa), das als Monomer vorliegt. Die Ansätze wurden dann für 15 min bei RT inkubiert und danach wurde die Reaktion mit 4 mM Lysin gestoppt. Im Anschluß an eine Dialyse bzw. Konzentrierung der Ansätze mit Microcon-10 Konzentratoren (Amicon) auf 20 µl wurde eine 15%ige Tricin-SDS-PAGE durchgeführt.

2.14.2 β -Protein-abhängige Rekombination *in vitro*

Mit diesem Test wurde die Aktivität der Proteine HupB, HupN und IHF sowie von HU-haltigen Fraktionen bestimmt. Das β -Protein, oder auch β -Rekombinase, wird codiert von einem Gen auf dem broad-host range Plasmid pSM19035 aus dem Gram-positiven Bakterium *Streptococcus pyrogenes* (Rojo & Alonso, 1994). In Anwesenheit von bakteriellen (z. B. Hbsu oder HU) oder eukaryotischen (HMG1) Chromatin-assoziierten Proteinen ist das β -Protein in der Lage, DNA-Rekombination zwischen zwei gleich-orientierten Rekombinationsstellen (*six sites*) *in vitro* durchzuführen (Alonso *et al.*, 1995). Als Substrat-DNA diente dabei das Plasmid pCB8, welches diese Rekombinationsstellen enthält. Im ursprünglichen Zustand von pCB8 entstehen nach einem Restriktionsverdau mit *Pst*I und *Sal*I drei Fragmente von 4,8 und zweimal 0,5 kb Länge. Nach erfolgter Rekombination an den *six sites* entstehen nach dem Verdau allerdings noch zusätzlich zwei Fragmente von 2,7 und 2,1 kb Länge.

Ein Reaktionsansatz von 25 µl setzte sich zusammen aus 10 nM pCB8, 25 mM Tris · HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 50 nM β -Protein und jeweils verschiedene Konzentrationen des zu testenden Proteins. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 200 nM Hbsu aus *Bacillus subtilis*. Hbsu sowie β wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Juan C. Alonso (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien) zur Verfügung gestellt. Die Ansätze wurden 1 h bei 30 °C und weitere 15 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen jeweils 1 µl einer 1,25 M NaCl-Lösung und je 10 Units *Pst*I und *Sal*I

hinzugefügt. Im Anschluß an den Verdau für 2 h bei 37 °C wurden jeweils 2 µl einer 1 mg/ml Proteinase K-Lösung zugegeben. Schließlich wurden je Ansatz 5 µl GMM-Puffer (s. 2.7.6) mit 0,2 % (w/v) SDS hinzugefügt und alle Ansätze mit einer 0,8%igen Agarosegelelektrophorese (2.7.6) analysiert.

2.14.3 Gel-Retentionsanalyse

Mit dieser Methode kann die Interaktion zwischen einem DNA-bindenden Protein und einem DNA-Molekül mit einer für das betreffende Protein spezifischen Bindungsstelle untersucht werden. Grundlage für dieses Untersuchungsverfahren ist die Tatsache, daß ein DNA-Fragment mit einem gebundenen Protein langsamer durch ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel wandert als ein freies DNA-Molekül, da die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt.

Zur Untersuchung der Bindung des IHF-Proteins aus *P. putida* an die IHF-Bindungsstelle eines Pu-Promotorfragments durch Gel-Retardation wurde das Verfahren nach De Lorenzo *et al.* (1991) angewendet. Als Pu-Promotorfragment diente ein ca. 230 bp langes, ³²P-markiertes *EcoRI-BstEII*-Fragment aus dem Plasmid pUC18-IHF2 (Bertoni *et al.*, 1998), das freundlicherweise von Dr. Giovanni Bertoni (Università degli studi di Milano, Italien) zur Verfügung gestellt wurde. Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25 µl setzte sich zusammen aus 25 mM Tris · HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 50 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 67 µg/ml BSA, 9 µg/ml Polyd(IC) (Pharmacia), 60 ng/ml markiertes Pu-Promotorfragment sowie verschiedene Mengen an aufgereinigtem IHF-Protein. Nach dem Mischen wurden die Ansätze für 30 min bei RT inkubiert, anschließend mit 2 µl GMM-Puffer (s. 2.7.6) versetzt und dann auf ein 5%iges Polyacrylamidgel (5 % (w/v) Bis-Acrylamid (40:1 von Bio-Rad), 25 mM Tris · HCl (pH 7,5),) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit Laufpuffer (25 mM Tris · HCl (pH 7,5) mit 1 mM EDTA) bei konstant 7 mA für ca. 3 h durchgeführt, anschließend wurde das Gel auf Filterpapier für 1 h bei 80 °C im Gelrockner getrocknet. Zur Belichtung eines Films wurde dieser zusammen mit dem getrockneten Gel in einer Filmkassette für einige Stunden oder ÜN bei -70 °C exponiert und dann mit Hilfe einer Entwicklungsmaschine entwickelt.

2.15 Methoden zur Untersuchung der Aktivierung von Promotoren sowie ihrer Transkriptionsaktivität

2.15.1 β-Galactosidase-Test

Das β-Galactosidase-codierende *lacZ*-Gen aus *E. coli* kann als Reportergen zur Untersuchung der Transkriptionsstärke eines Promotors verwendet werden. Die Transkriptionsstärke wird

hierbei indirekt über die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt, indem photometrisch bei 420 nm die Bildung von *o*-Nitrophenol gemessen wird, das aus der Spaltung des *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosids (ONPG) durch die β -Galactosidase hervorgeht. Das *lacZ*-Gen bietet sich als Reportergen bei Bodenbakterien wie *P. putida* an, da diese meistens, im Gegensatz zu Enterobakterien, keine β -Galactosidase besitzen.

Für die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität von Bakterien nach Miller (1972) wurde zunächst die Zelldichte der zu untersuchenden Bakterienkultur bei 600 nm gemessen. 100 μ l dieser Kultur wurden dann mit 20 μ l Chloroform, 20 μ l 0,1 % (w/v) SDS und 0,9 ml Puffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -Mercaptoethanol) gemischt und für 15 min bei 28 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 ml einer ONPG-Lösung (4 mg/ml ONPG in Puffer Z ohne β -Mercaptoethanol) gestartet. Die Ansätze wurden dann solange bei 28 °C weiterinkubiert, bis sich eine intensive Gelbfärbung bildete, worauf die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml einer 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt wurde. Anschließend wurde die Reaktionszeit notiert und die Absorption wurde bei 420 nm und 550 nm photometrisch bestimmt. Nach folgender Formel wurde die β -Galactosidase-Aktivität berechnet, wobei *t* die Reaktionszeit in min und *V* das Probenvolumen der Zellen in ml (hier: 0,1 ml) darstellen:

$$\text{Miller-Units} = \frac{1000 \cdot (\text{OD}_{420} - 1,75 \cdot \text{OD}_{550})}{t \cdot V \cdot \text{OD}_{600}}$$

Die auf diese Weise berechneten Miller-Units sind proportional zur Bildung von *o*-Nitrophenol pro min und pro Bakterium.

2.15.2 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription ist ein Verfahren, bei dem zellfrei, d. h. unter Verwendung der bei der Transkription beteiligten Proteine, mRNA *in vitro* synthetisiert wird. Durch die radioaktive Markierung der mRNA kann direkt die Menge an Transkript gemessen werden, was wiederum Aufschluß über die Stärke bzw. die Transkriptionsaktivität von Promotoren gibt. Auf diese Weise ist es möglich, den Einfluß von bestimmten Bedingungen oder spezifischen Proteinen auf die Transkription zu bestimmen.

Zur Untersuchung der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Ps1 und Pu wurden insgesamt die Proteine RNA-Polymerase (Core-Enzym), σ^{54} , XylR Δ A (freundlicherweise von Herrn Dr. V. de Lorenzo, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien, zur Verfügung gestellt), IHF und HupB sowie HupN verwendet, die ausschließlich von *P. putida* stammen.

Während die Konzentrationen von RNA-Polymerase und σ^{54} konstant gehalten wurden, wurden verschiedene Mengen der anderen Proteine eingesetzt, um deren Effekt auf die Transkription zu bestimmen.

Alle die bei der *in vitro*-Transkription verwendeten Lösungen, Puffer und das Milli-Q-H₂O wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) zweifach autoklaviert. DEPC inaktiviert Ribonucleasen, die die in der *in vitro*-Transkription synthetisierte mRNA abbauen können, und es zerfällt beim Autoklavieren in CO₂ und Ethanol.

Ein Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 μ l enthielt neben den Proteinen noch folgende Komponenten: 40 mM Tris \cdot HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 0,02 mM EDTA, 0,2 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM ATP und 0,6 Units RNasin (Ribonuclease-Inhibitor, Promega). Alle Ansätze enthielten außerdem 5 nM DNA-Template, 400-500 nM RNA-Polymerase-Core-Enzym sowie 1,8 μ M σ^{54} . Weiterhin wurden, außer den Negativkontrollen, jedem Ansatz 400 nM des Aktivatorproteins XylR Δ A zugesetzt. Aufgrund der geringen spezifischen Aktivität der aufgereinigten RNA-Polymerase ergaben sich relativ hohe Protein- und somit auch Glycerinkonzentrationen (insgesamt ca. 12 % (v/v) Glycerin) in den Reaktionsansätzen. Deshalb wurde auf die zusätzliche Zugabe von BSA und Glycerin verzichtet, welche sonst standardmäßig als Stabilisatoren in der *in vitro*-Transkription eingesetzt werden.

Der Puffer und die entsprechenden Proteine wurden in einem Vol von 45 μ l auf Eis gemischt und 10-15 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch die Zugabe von 5 μ l NTP-Mix (NTP-Endkonzentrationen in den Ansätzen: 400 μ M ATP, CTP, GTP, 50 μ M UTP und 7 μ Ci [α -³²P]UTP bei 3000 Ci/mmol) wurde die Reaktion gestartet und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 50 μ l Stop-Mix (5 M Ammoniumacetat, 50 mM EDTA, 0,5 mg/ml Carrier-tRNA (Sigma)) wurden 200 μ l eiskalter, absoluter Ethanol zugegeben und die Ansätze wurden für 30 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 13000 Upm und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet wurde kurz, ohne Vakuum bei 37 °C getrocknet und dann bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die mRNA-Pellets wurden aufgetaut und in jeweils 15 μ l Probenpuffer (1 \times TBE mit 7 M Harnstoff, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau und 0,05 % (w/v) Xylen-Cyanol) gelöst und dann für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff (50 ml eines 4%igen Gels wurden hergestellt aus 5 ml 40% (w/v) Bis-Acrylamid (Bio-Rad), 5 ml 10 \times TBE, 21,02 g Harnstoff, 171 μ l 10 % (w/v) APS, 71 μ l TEMED und Milli-Q-H₂O *ad* 50 ml) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 \times TBE als Laufpuffer bei konstant 500 V für ca. 1 h durchgeführt. Danach wurde das Gel auf Filterpapier für 1 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet und dann zur Belichtung eines Films in eine Filmkassette gelegt und bei -80 °C gelagert. Die Filme wurden je nach Stärke der Signale 1 h oder für mehrere Tage exponiert. Die Bestimmung der Signalstärke von einzelnen Banden auf dem Film erfolgte mit einem Bio-Rad-Densitometer und der zugehörigen Multi-Analyst-Software.

2.16 Datenverarbeitung

Folgende Computerprogramme wurden verwendet:

- Textverarbeitung Microsoft Word 7.0 für Windows 95
- Graphische Darstellung und SigmaPlot für Windows, Vers. 1.2 (Jandel Scientific)
Auswertung von Meßdaten
- Darstellung von chemischen ChemWindow for Windows, Vers. 1.0 (SoftShell)
Formeln
- Bildverarbeitung und Erstellung Canvas für Windows 95, Vers. 5.0.2 (Deneba Systems)
von Abbildungen
- Darstellung von Plasmiden MacPlasmap Vers. 2.05 (CGC Scientific)
- Analyse und Auswertung von ABI PRISM™ DNA Sequencing Software, Vers. 2.1.2,
Elektropherogrammen aus der Applied Biosystems
DNA-Sequenzierung
- Densitometrische Bestimmung Multi-Analyst™, Vers. 1.1, Bio-Rad
- Darstellung, Editierung und Gene Works Vers. 2.5.1 N (Oxford Molecular Group)
Analyse von DNA- und Protein-
sequenzen
DNA Strider Vers. 1.2 (Christian Marck, Service de
Biochimie et de Génétique Moléculaire, Gif-Sur-
Yvette, Cedex, France)
Wisconsin Package Vers. 9.1 (Genetics Computer
Group, GCG)
Phylip (Phylogeny Inference Package) Vers. 3.5
(Felsenstein, 1985)
ClustalX Vers. 1.6.4b (Thompson *et al.*, 1997)

3. Experimente und Ergebnisse

Für das zu etablierende *in vitro*-Transkriptionssystem wurden im Laufe dieser Arbeit die *P. putida*-Proteine HupB, HupN, IHF, Sigma-54 (σ^{54}) und das RNA-Polymerase Core-Enzym aufgereinigt. Hierzu war es zunächst notwendig, die Gene für HupB und HupN zu identifizieren, isolieren, sequenzieren und zu charakterisieren. Für die Reinigung wurden anschließend Produktionsstämme erzeugt, die HupB bzw. HupN in großer Menge synthetisieren. Während das Gen für σ^{54} bereits isoliert vorlag, waren im Falle des IHF anfangs nur die Nukleotidsequenzen des *ihfA*- und *ihfB*-Gens bekannt. Zur Überexpression wurden diese Gene dann in geeigneter Weise kloniert und in Produktionsstämme transferiert. Das RNA-Polymerase Core-Enzym wurde nativ aus dem *P. putida* Wildtypstamm aufgereinigt.

Mit den isolierten Proteinen und dem Aktivator-Protein XylR Δ A wurde dann die Aktivierung der *xyl*-Promotoren Pu und Ps1 *in vitro* untersucht.

3.1 Klonierung und Charakterisierung zweier HU-Proteine codierender Gene von *P. putida* KT2442

3.1.1 Identifizierung, Isolierung und Klonierung von *hupB*

Ein Gen (*hupB*), das für ein HU-Protein in *Pseudomonas aeruginosa* codiert, wurde von Delic-Attree *et al.* (1995) isoliert und sequenziert. Das von diesem Gen codierte Protein ist zu 79 % identisch mit dem HupB-Protein aus *E. coli*. Es war anzunehmen, daß *P. putida* aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *P. aeruginosa* ein dem *hupB*-Gen sehr ähnliches Gen besitzt. Vor diesem Hintergrund wurden Primer auf der Basis der *hupB*-Nukleotidsequenz von *P. aeruginosa* entworfen, die dann in einer PCR mit $T_a = 40^\circ\text{C}$ und genomischer DNA aus *P. putida* als Template eingesetzt wurden. Auf diese Weise wurde mit den Primern PLHU2 und PRHU1 (s. 2.10) ein ca. 220 bp langes PCR-Fragment erhalten, welches in den Vektor pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert wurde. Die Sequenzierung dieses Fragments in pCR2.1 ergab, daß das PCR-Fragment zu 83 % identisch mit der entsprechenden Region des *hupB*-Gens von *P. aeruginosa* war (s. Abb. 3.1).

		PLHU2	
Pae_hupB	ATGAACAAGTCGGAAGT	GATCGACGCAATTGCCGCATCTGCTGATATCCC	50
Ppu_Frag	-TGAACAAGTCGGAAGT	GATTGACGCTATCGCCGCATCTGCAGACATCCC	49
	*****	***** ** ***** ** *****	
Pae_hupB	GAAAGACGTTGCCGGT	TCGCGCACTGGACGCAGTGATCGAGTCCGTCCTG	100
Ppu_Frag	GAAAGCTGTAGCCGGC	CGTTCGCGCTGGACGCAGTCATCGAATCCGTCACCG	99
	*****	** ***** ** ** ***** ***** ***** *	
Pae_hupB	GCGCCCTGAAGGCTGGT	GACTCCGTCGTGCTGGTTGGTTTCGGCACCTTC	150
Ppu_Frag	GCGCCCTGAAGCAAGGT	GACGATGTGGTACTGGTTGGCTTTGGTACCTTC	149
	*****	***** ** ** ***** ** ** *****	
Pae_hupB	GCTGTCAAAGAGCCCG	CTGCTCGCACCGGTCGCAACCCGCAAACCTGGCAA	200
Ppu_Frag	TCGGTCAAGGAGCGCG	CCGAGCGTACTGGCCGCAACCCGCAAACCGGCAA	199
	*	***** ** ** ***** ***** *****	
		PRHU1	
Pae_hupB	GCCGATCAAGATCGCT	GCCAAGATCCCGGGCTTCAAAGCCGGTAAGGCCC	250
Ppu_Frag	GCCGATCAAGATCGCT	-----	215

Pae_hupB	TGAAGGATGCTGTCA	ACTAA	270
Ppu_Frag	-----		

Abb. 3.1: Alignment der Nukleotidsequenz des erhaltenen Fragments (Ppu_Frag) aus einer PCR mit *P. putida*-DNA und dem *hupB*-Gen von *P. aeruginosa* (Pae_hupB). Identische Basen sind mit "*" gekennzeichnet und die Primer zur Amplifikation des Fragments sind mit einem Strich oberhalb der Basen markiert.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen dem PCR-Fragment und dem *hupB*-Gen von *P. aeruginosa* war zu erwarten, daß auch *P. putida* ein funktionales *hupB*-Gen besitzt. Um die vollständige Nukleotidsequenz dieses *hupB*-Gens aus *P. putida* zu erhalten, wurde zunächst versucht, mit Hilfe von PCR die von der entsprechenden Region des PCR-Fragments stromabwärts und stromaufwärts gelegenen Sequenzen zu amplifizieren. Hierzu wurden Primer auf Basis der *hupB*-Sequenz von *P. aeruginosa* hergestellt, die stromaufwärts vom Startcodon bzw. stromabwärts vom Stopcodon hybridisieren. Diese Primer wurden dann in Kombination mit den Primern PLHU2 und PRHU1 in PCR-Reaktionen mit genomischer DNA von *P. putida* und bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen eingesetzt. Es konnten jedoch keine PCR-Produkte der erwarteten Größe oder mit signifikanten Sequenz-Homologien zu *hupB* von *P. aeruginosa* erhalten werden.

Da somit mittels dieser PCR-Strategie die vollständige Sequenz von *hupB* nicht erhalten werden konnte, wurde das „klassische“ Verfahren zur Klonierung von Genen angewendet, d.h. Durchführung einer Southern Blot-Hybridisierung, Anfertigung einer Mini-Genbank und

schließlich ein Screening nach einem *hupB*-enthaltenden Klon.

Zunächst wurde eine *hupB*-spezifische, Digoxigenin-markierte DNA-Sonde, wie unter 2.11.1 beschrieben, in einer PCR mit den beiden Primern PRHU1 und PLHU2 hergestellt. Für das anschließende Southern-Blotting (s. 2.11.2) wurde genomische DNA von *P. putida* mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sac*I, *Sph*I und *Xba*I verdaut und in einer 0,8 %igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für diese ausgewählten Enzyme besitzt das PCR-Fragment des *hupB*-homologen Gens aus *P. putida* keine Schnittstellen. Als Kontrolle wurde ungeschnittene genomische DNA von *E. coli* aufgetragen. Die darauf folgende Sondenhybridisierung und immunologische Detektion erfolgte wie unter 2.11.3 bzw. 2.11.4 beschrieben. Wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, hybridisierte die Sonde mit den verschiedenen Restriktionsverdaus von *P. putida* DNA. Während sie bei der *Bam*HI-, *Hind*III-, *Sph*I- und *Xba*I-geschnittenen DNA allerdings mit relativ großen Fragmenten hybridisierte, zeigten sich bei der *Eco*RI- und *Sac*I-verdauten DNA deutlich kleinere Fragmente. Im Falle des *Sac*I-Verdaus hybridisierte die Sonde mit einem ca. 6 kb großen Restriktionsfragment. Ein schwaches Signal zeigte sich bei der unverdauten *E. coli*-DNA.

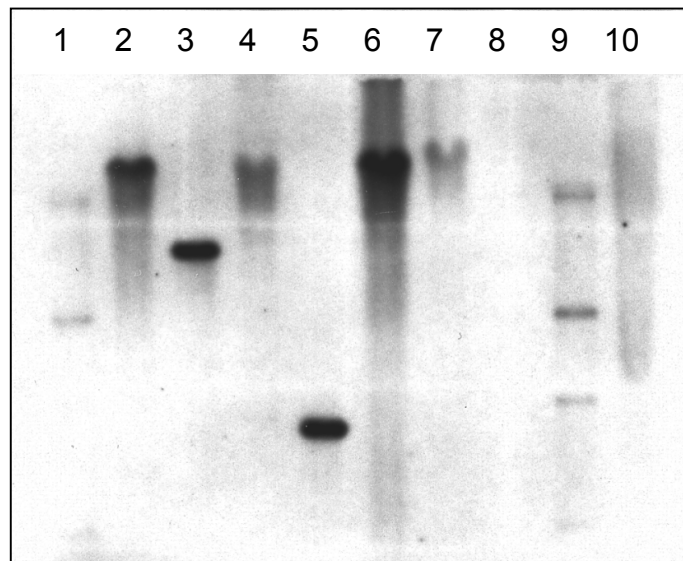


Abb. 3.2: Southern Blot-Hybridisierung verdauter genomischer DNA von *P. putida* mit der *hupB*-Gensonde. Spur 1 und 9: Digoxigenin-markierter Längenstandard M II (Boehringer Mannheim), Spur 8: Digoxigenin-markierter Längenstandard M VI (Boehringer Mannheim), Spur 10: unverdaute genomische DNA von *E. coli*. In den Spuren 2 bis 7 befinden sich die Verdaue der *P. putida*-DNA mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (2), *Eco*RI (3), *Hind*III (4), *Sac*I (5), *Sph*I (6) und *Xba*I (7).

Aufgrund der Größe des genomischen *SacI*-Fragments von ca. 6 kb war die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, daß es das *hupB*-Gen in voller Länge enthielt. Außerdem hat das Fragment mit 6 kb eine zur Klonierung gut geeignete Größe, so daß es zur weiteren Klonierung bzw. Identifizierung von *hupB* ausgewählt wurde. Hierzu wurden zunächst 40 µg genomische DNA von *P. putida* mit *SacI* vollständig verdaut und in einer 0,8 %igen Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA der Größe 5,5 bis 6,5 kb aus dem Gel geschnitten und mit Hilfe einer Elektroelutionsapparatur (Biotrap, Schleicher & Schuell) nach Herstellerangaben extrahiert. Das Fragmentgemisch wurde dann mit *SacI*-geschnittener Vektor-DNA von pZErO-2 ligiert. pZErO-2 (Zero Background Cloning Kit, Invitrogen) ist ein Klonierungsvektor, der die Selektion von Bakterienklonen, die Plasmide mit einem Insert enthalten, stark verbessert. Hierbei wird durch Insertion eines DNA-Fragments in die Multicloningsite des Vektors das *ccdB*-Gen zerstört, welches im funktionsfähigen Zustand letal für *E. coli* ist. Somit wird das Wachstum von Klonen mit Plasmiden ohne Insert unterdrückt. Der Ligationsansatz wurde schließlich durch Elektroporation in *E. coli*-TOP10 F'-Zellen transferiert, die dann auf LB-Kan-Platten mit 1 mM IPTG ausplattiert wurden.

Um nun einen positiven Bakterienklon - d. h. einen Klon, der den Vektor mit inseriertem *SacI*-Fragment enthält - zu finden, wurde eine sog. Colony Batch PCR durchgeführt. Hierbei wird Zellmaterial von bis zu 10 verschiedenen Bakterienkolonien zusammen verwendet (s. 2.10) und zunächst auf die Präsenz eines positiven Klons getestet. Insgesamt 160 auf Platten gewachsene Bakterienkolonien wurden durchnummeriert und in Gruppen von ca. 10 in 16 PCR-Ansätzen verwendet. Es wurden die Primer PRHU1 und PLHU2 bei einer $T_a = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwendet. Von den 16 PCRs konnte in 4 Fällen das ca. 220 bp große Fragment erhalten werden. Von den 4 positiven Gruppen wurden dann 2 ausgewählt, deren einzelne Klone (insgesamt 15) in einer weiteren PCR unter gleichen Bedingungen analysiert wurden. Von den 15 Klonen konnten wiederum 3 als positiv identifiziert werden, die als pFBT8a, pFBT8b und pFBT8c bezeichnet wurden. Durch Restriktionsverdau wurde ermittelt, daß alle 3 Plasmide ein 6 kb großes Insert enthielten.

Um die vollständige Nukleotidsequenz von *hupB* zu erhalten, wurden Sequenzierreaktionen jeweils mit den Primern PLHU1 und PRHU2 und den Plasmiden pFBT8a - b als Template durchgeführt. Beide Primer wurden bereits zur Amplifikation des ca. 220 bp großen *hupB*-Fragments verwendet und ermöglichen weiterhin die Sequenzierung der Regionen stromaufwärts und stromabwärts des *hupB*-Fragments. Die durch die Sequenzierung erhaltene, vollständige *hupB*-Nukleotidsequenz ist in Abb. 3.3 dargestellt und war für alle 3 Plasmide identisch.

```

GCTTTCCTTGACAGTATTTTCGGCGCCTTGCTATAAAGCGGCACGTTATTGTGCGCCATGC   60
      -35                               -10

CTCCCAGCACACGTTTCATAAGCTTTTCATTACATACTTAGAAACAAACTCAATAGAGAA   120



### hupB



ATAAGGGGACTTAGAGTGAACAAGTCGGAAGTATTGACGCTATCGCCGCATCTGCAGAC   180
      M N K S E L I D A I A A S A D

ATCCCGAAAGCTGTAGCCGGCCGTGCGCTGGACGCAGTCATCGAATCCGTCACCGGCGCC   240
      I P K A V A G R A L D A V I E S V T G A

CTGAAGCAAGGTGACGATGTGGTACTGGTTGGCTTTGGTACCTTCTCGGTCAAGGAGCGC   300
      L K Q G D D V V L V G F G T F S V K E R

GCCGAGCGTACTGGCCGCAACCCGCAAACCGGCAAGGCAATCAAGATCGAAGCCGCCAAG   360
      A E R T G R N P Q T G K A I K I E A A K

GTTCCAGGTTTCAAGGCCGGCAAAGGCCTGAAAGACGCCGTCAACTAAGTCGTCTTTCAG   420
      V P G F K A G K G L K D A V N *

CCGGACCCGGCCTGGCCTGGTCCGAGCACGGTGATGGCGGGGCGCAAACGTTCCCGCCTG   480

```

Abb. 3.3: Nukleotidsequenz des *hupB*-Gens aus *P. putida* KT2442 und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Consensus-Sequenzen der -35 und der -10 Promotor-Region sind eingerahmt und die der Shine-Dalgarno-Sequenz entsprechende Region ist unterstrichen.

Ein Vergleich der Nukleotidsequenz von *hupB* aus *P. putida* KT2442 mit *hupB* aus *P. aeruginosa* ergab, daß beide Sequenzen zu 81 % identisch sind. Der Vergleich der von *hupB* aus *P. putida* abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der von HupB aus *P. aeruginosa* und *E. coli* (Kano *et al.*, 1985) ergab, daß die Sequenzen zu 88 % (*P. aeruginosa*) bzw. 79 % (*E. coli*) identische Aminosäuren besitzen. Zu HupA, der α -Untereinheit von HU aus *E. coli* (Kano *et al.*, 1987), wurde dagegen eine Identität von nur 61 % ermittelt, was eindeutig zeigt, daß HupB aus *P. putida* zur Unterfamilie IIIb der heterodimeren HU Proteine (HupB-Gruppe) zählt (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). Ein Alignment der HupB-Proteine aus *P. putida*, *P. aeruginosa* und *E. coli* ist in Abb. 3.4 dargestellt. Die meisten der Aminosäureaustausche (13 von 19) zwischen HupB aus *P. putida* und *E. coli* sind konservierte, während zwischen HupB aus *P. putida* und *P. aeruginosa* nur die Hälfte der Aminosäureaustausche (5 von 10) konservierte sind. Darüber hinaus besitzt HupB aus *P. putida* die gleiche Länge wie das homologe Protein aus *E. coli* (90 AS), während HupB aus *P. aeruginosa* aufgrund einer Deletion von 3 Nukleotiden in der Nähe des 3'-Endes von *hupB* um eine AS kürzer ist. Die

stromaufwärts von *hupB* aus *P. putida* lokalisierten Consensus-Sequenzen für die -35 und -10 Region von *E. coli*-Promotoren lassen den Schluß zu, daß die Transkription von *hupB* wahrscheinlich von einem σ^{70} -abhängigen Promotor reguliert wird.

Ppu_HupB	MNKSELIDAI	AASADIPKAV	AGRALDAVIE	30
Pae_HupBD.	30
Eco_HupBQ...K.	..G...S..AI.A	30
Ppu_HupB	SVTGALKQGD	DVVLVGFGTF	SVKERAERTG	60
Pae_HupBA..	S.....	A...P.A...	60
Eco_HupB	...ES..E..	..A.....	A.....A...	60
Ppu_HupB	RNPQTGKAIK	IEAAKVPGFK	AGKGLKDAVN	90
Pae_HupBP..	.-...I....	...A.....	89
Eco_HupBE.T	.A.....S.R	...A.....	90

Abb. 3.4: Alignment der HupB-Proteine von *P. putida* (Ppu_HupB), *P. aeruginosa* (Pae_HupB) und *E. coli* (Eco_HupB). Die zur HupB-Sequenz von *P. putida* identischen Aminosäuren sind als Punkte dargestellt.

3.1.2 Identifizierung von *hupN* aus *P. putida* KT2442

In *P. putida* mt-2, einem parentalen Stamm von *P. putida* KT2442, haben Nakazawa *et al.* (1993) ein weiteres Gen (in dieser Arbeit als *hupN* bezeichnet) identifiziert, das ebenfalls für ein HU-Protein codiert. Da die *hupN*-Nukleotidsequenz zur Zeit der Anfertigung dieser Arbeit noch nicht veröffentlicht war, wurde sie freundlicherweise von T. Nakazawa (Department of Microbiology, Yamaguchi University School of Medicine, Ube, Yamaguchi 755, Japan) zur Verfügung gestellt. Um zu überprüfen, ob *hupN* in KT2442 als funktionales Gen vorliegt, wurde eine PCR mit den Primern PLNAK5 und PRNAK6 (s. 2.10) bei $T_a = 50^\circ\text{C}$ und genomischer DNA von *P. putida* KT2442 als Template durchgeführt. Die beiden Primer waren auf der Basis der Nukleotidsequenz von *hupN* aus *P. putida* mt-2 hergestellt worden. PLNAK5 hybridisiert stromaufwärts und PRNAK6 stromabwärts von *hupN* und ermöglichen so die Amplifikation des gesamten Gens. Es wurde ein PCR-Produkt von ca. 360 bp erhalten, das zunächst in pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert wurde. Die erhaltene Nukleotidsequenz des PCR-Produktes stimmte exakt mit der von *hupN* aus *P. putida* mt-2 überein. Hiermit wurde bewiesen, daß der Stamm KT2442 zwei Gene, *hupB* und *hupN* besitzt, die jeweils für HU-Proteine codieren.

In Abb. 3.5 ist ein Alignment der HU-Proteine HupB und HupN aus KT2442 dargestellt. Die Proteine sind zu 45 % identisch und 28 der 49 Aminosäureaustausche sind

konservierte. Das HU-Protein von *Vibrio proteolyticus* (Giladi *et al.*, 1992b) ist zu 50 % mit HupN identisch und damit in den Proteindatenbanken das Protein, das die höchste Homologie zu HupN aufweist.

```

Ppu_HupB    --MNKSELIDAIASADIPKAVAGRALDAVIESVT 33
Ppu_HupN    MALTQDQLIADIAESIAAPKATAKNALEQLGQIVA 35
              :.*.:**  ** *   ***.*  .**.: : : *:

Ppu_HupB    GALKQGDDVVLVGFGTFSVKERAERTGRNPQTGKA 68
Ppu_HupN    DQLENGAEITLPGIGKLVSERPARTGRNPSTGAA 70
              . *::*  :.:*  *::*.:*.**.*  *****.* *

Ppu_HupB    IKIEAAKVPGFKAGKGLKDAVN-          90
Ppu_HupN    IEIAAKKVVKFVPAKVLTDANK          93
              *: *  *  *  *  . *  *.**.*

```

Abb. 3.5: Alignment von HupB (Ppu_HupB) und HupN (Ppu_HupN) aus *P. putida* KT2442. Identische Aminosäuren sind mit "*", stark konservierte mit ":" und schwach konservierte sind mit "." gekennzeichnet.

3.1.3 Identifizierung eines zu *hupN* homologen Gens in *P. aeruginosa*

Die Tatsache, daß zwei unterschiedliche Gene für HU-Proteine in *P. putida* KT2442 existieren, war ein Novum, weil diese Eigenschaft bisher nur bei Enterobakterien gefunden wurde (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). Daher stellte sich die Frage, ob noch weitere Bakterien außerhalb der Gruppe der Enterobakterien zwei HU-Gene besitzen. Im Fall von *P. aeruginosa* wurde bereits ein *hupB*-Gen kloniert (Delic-Attree *et al.*, 1995). Die bereits veröffentlichte und vorläufige DNA-Sequenz des *P. aeruginosa*-Genoms wurde nach einem zu *hupN* homologen Gen durchsucht. Hierzu wurde das BLAST-Programm zur Homologie-Suche sowie das Sequence Data Retrieval Tool auf der Webseite des Pseudomonas Genome Projekts (PGP, 1999) verwendet. Es konnte ein offenes Leseraster von Position 90509 bis 90227 auf dem Minus-Strang von Contig 91 (Version 12/15/98) identifiziert werden, das hohe Homologie zu *hupN* aufwies. Dieses offene Leseraster ist zu 75 % identisch mit *hupN* und hat die gleiche Länge. Da es außerdem eine Ribosomenbindestelle besitzt (Abb. 3.6), handelt es sich hierbei offenbar um ein zu *hupN* aus *P. putida* homologes Gen. Bei einem Vergleich der HupN-Proteinsequenzen von *P. putida* und *P. aeruginosa* zeigt sich, daß sie zu 77 % identische AS besitzen und daß die meisten Aminosäureaustausche konserviert und in der N-terminalen Hälfte der Proteine lokalisiert sind (Abb. 3.7).

		SD	
Contig91	AGGCCCTCGCGCAGTCTTTTACCAAGGAGCTACACCACCAATGGCACTGA	50	
Ppu-hupN	-----ATGGCATTGA	10	
	***** **		
Contig91	CCAAAGACCAACTGATCCAGGACATCGCCGAAGCCATCGACGCGCAGAAG	100	
Ppu-hupN	CCAAAGACCAACTGATTGCCGACATCGCCGAATCGATCGCCGCGCCAAAA	60	
	***** * **** ** *		
Contig91	ACCACCGTTTCGACGCGCTCGACCAGCTCGCCGAGATCGTCAAGGACGC	150	
Ppu-hupN	GCCACCGCCAAGAACGCTCTGGAGCAACTGGGCCAGATCGTTGCTGACCA	110	
	***** * *** ** * * * * * *		
Contig91	CCTGGAGAACGATGGCGAAATCACCTGCCGGGTATCGGCAAGCTGAAGG	200	
Ppu-hupN	ACTGGAAAACGGCGCTGAAATCACTCTGCCAGGCATCGGCAAGCTGAAAG	160	
	***** * **** ** * **** ** *		
Contig91	TCTCCGAGCGTCCCGCGCGCACCGCCGCAACCCGACAGCCGGCAAGGCG	250	
Ppu-hupN	TCTCCGAGCGTCCTGCCCGTACCGCCGCAACCTTCGACTGGCGCTGCC	210	
	***** ** * **** ** * **** ** *		
Contig91	ATCGAGATCGCTGCCAAGCGTGTAGCCAAGTTCGTTCCGGCCAAGGCGCT	300	
Ppu-hupN	ATCGAAATCGCTGCCAAGAAAGTCGTCAAGTTCGTTCCAGCCAAAGTGCT	260	
	***** ** * **** ** * **** * *		
Contig91	GACCGACGCGATCAACGGCTGATAACGGCCCGCCGATCCCGCACGGATGC	350	
Ppu-hupN	GACCGACGCCATCAACAAGTAA-----	282	
	***** * *		

Abb. 3.6: Alignment eines genomischen Fragments aus *P. aeruginosa* (Contig91) und *hupN* aus *P. putida* (Ppu_hupN). Die der Shine-Dalgarno-Sequenz entsprechende Region ist eingerahmt und das Startcodon des zu *hupN* homologen Gens ist fett dargestellt. Identische Nukleotide sind mit "*" markiert.

Ppu_HupN	MALTKDQLIADIAESIAAPKATAKNALEQLGQI	33
Pae_HupN	MALTKDQLIQDIAEAIDAQKTTVRSALDQLAEI	33
	***** : * * * : * . : . * : * * . : *	
Ppu_HupN	VADQLENGAEITLPGIGKLVSERPARTGRNPS	66
Pae_HupN	VKDALENDGEITLPGIGKLVSERPARTGRNPQ	66
	* * * * . . ***** .	
Ppu_HupN	TGAAIEIAAKKVVKFVPAKVLTDANK	93
Pae_HupN	TGKAIEIAAKRVAKFVPAKALTDANG	93
	** ***** : * . ***** . *****	

Abb. 3.7: Alignment der HupN-Proteine aus *P. aeruginosa* (Pae_HupN) und *P. putida* (Ppu_HupN). Identische Aminosäuren sind mit "*", stark konservierte mit ":" und schwach konservierte sind mit "." gekennzeichnet.

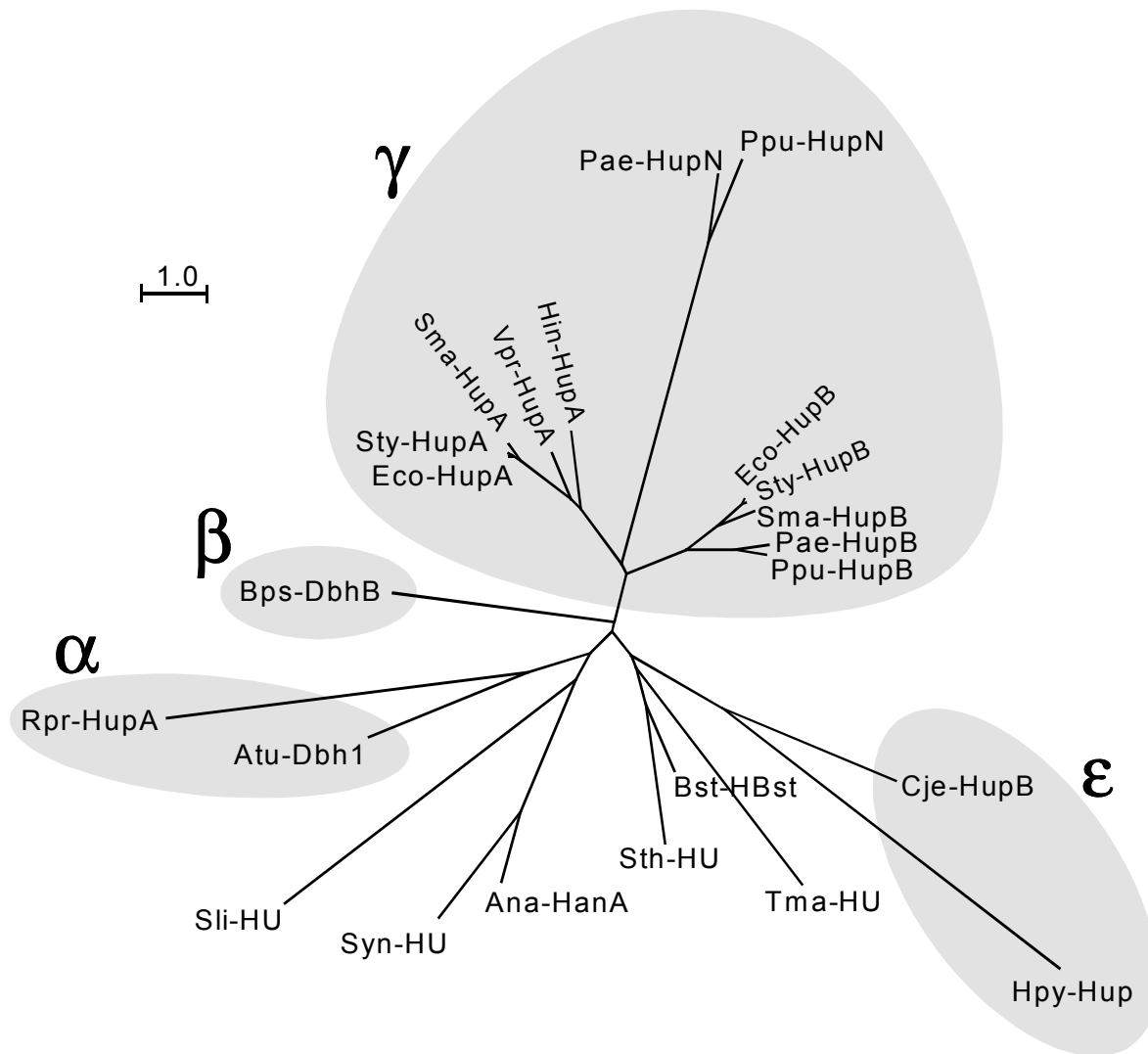


Abb. 3.8: Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter HU-Proteine aus Eubakterien. Das Dendrogramm wurde generiert, indem mit dem Programm "CLUSTAL_X" ein Protein-Alignment erzeugt wurde, das als Grundlage für die Erstellung des Stammbaumes mit Hilfe des Programms "Protdist" des Programmpaketes "PHYLIP" diente. Die Proteine der Bakterien, die zu den Untergruppen der α -, β -, γ - und ϵ -Proteobakterien zählen, sind entsprechend mit einem grauen Hintergrund markiert. Der horizontale Balken entspricht einer Distanz bzw. Divergenz von 1,0 %. Die Abkürzungen stehen für die Proteine folgender Organismen einschließlich ihrer Swiss-Prot- bzw. GenBank-Codes: Ana-HanA für HanA aus *Anabaena* sp. PCC7120 (P05514), Atu-Dbh1 für HRL18 aus *Agrobacterium tumefaciens* (P02347), Bps-DbhB für DbhB aus *Burkholderia pseudomallei* (AF110185), Bst-HBst für HBst aus *Bacillus stearothermophilus* (P02346), Cje-HupB für HupB aus *Campylobacter jejuni* (L25627), Eco-HupA für HupA aus *Escherichia coli* (P02342), Eco-HupB für HupB aus *Escherichia coli* (P02341), Hin-HupA für HupA aus *Haemophilus influenzae* (P43722), Hpy-Hup für HU aus *Helicobacter pylori* J99 (O25506), Pae-HupB für HupB aus *Pseudomonas aeruginosa* (P05384), Pae-HupN für HupN aus *Pseudomonas aeruginosa*, Ppu-HupB für HupB aus *Pseudomonas putida* KT2442, Ppu-HupN für HupN aus *Pseudomonas putida* KT2442, Rpr-HupA für HupA aus

Rickettsia prowazekii (AJ235270), Sli-HU für HU aus *Streptomyces lividans* (O06447), Sma-HupA für HupA aus *Serratia marcescens* (P52680), Sma-HupB für HupB aus *Serratia marcescens* (P52681), Sth-HU für HU aus *Streptococcus thermophilus* (P96045), Sty-HupA für HupA aus *Salmonella typhimurium* (P15148), Sty-HupB für HupB aus *Salmonella typhimurium* (P05515), Syn-HU für HU aus *Synechocystis* PCC6803 (P73418), Tma-HU für HU aus *Thermotoga maritima* (P36206) and Vpr-HupA für HupA aus *Vibrio proteolyticus* (P28080).

3.1.4 Phylogenetische Beziehungen zwischen HU-Proteinen

Der Befund, daß zumindest einige Pseudomonaden neben einem HupB- zusätzlich ein HupN-Protein besitzen, wirft die Frage auf, in welchem verwandtschaftlichen Verhältnis insbesondere die HupN-Proteine zu anderen HU-Proteinen stehen. Hierzu sind in Abb. 3.8 die phylogenetischen Beziehungen zwischen ausgewählten HU-Proteinen aus Eubakterien dargestellt. Sehr deutlich ist zunächst die unterschiedliche Gruppierung in HupA- bzw. HupB-Proteine zu erkennen. HupA/HupB-heterodimeres HU ist ein Charakteristikum für Enterobakterien (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). Zwischen den Ästen, die zu den HupA- und HupB-Proteinen führen, liegt der Ast für die HupN-Proteine. Die Ursprünge aller drei Gruppen liegen sehr nah beieinander, was die Existenz eines gemeinsamen Vorläuferproteins von HupA, HupB und HupN wahrscheinlich macht. Da in der Abb. 3.8 die Astlänge proportional zur Divergenz der Aminosäuresequenzen ist, haben sich die HupN-Proteine im Laufe ihrer evolutionären Entwicklung weiter von den anderen Hup-Proteinen entfernt als die HupA- von den HupB-Proteinen.

Die Existenz von zwei HU-Proteinen bleibt nicht nur auf die Enterobakterien beschränkt, sondern weitet sich aus auf zumindest einige Pseudomonaden. Die Enterobakterien sowie *P. aeruginosa* und *P. putida* gehören zur Gruppe der γ -Proteobakterien, welche somit möglicherweise generell durch die Existenz von zwei HU-Proteinen charakterisiert ist. Darüber hinaus erscheinen die HupA-, HupB- und HupN-Proteine deutlich von anderen HU-Proteinen entfernt, was ihre Zuordnung zu einer Gruppe nahelegt. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß *Burkholderia pseudomallei*, obwohl relativ nah mit den Pseudomonaden verwandt, zu den β -Proteobakterien gehört und nur ein HU-Protein besitzt (s. Abb. 3.8).

3.1.5 Aufreinigung nativen HU-Proteins aus *P. putida* KT2442

Zur Überprüfung, ob natives HU-Protein aus *P. putida* KT2442 HupB und/oder HupN enthält, wurde eine Aufreinigung wie unter 2.13.1.1 bzw. 2.13.2 beschrieben durchgeführt. Es wurden 4 l LB-Medium, die 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Rifampicin enthielten, mit 1/50 Vol einer ÜN-Kultur von *P. putida* KT2442 angeimpft und bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 3 inkubiert. Da hierbei kein rekombinantes Gen überexprimiert wurde, war es nicht notwendig, wie unter

2.13.1.1 dargestellt mit IPTG zu induzieren.

Bei der Chromatographie mit Heparin-Sepharose CL-6B (2 ml Säulenvolumen) wurde gebundenes Protein mit einem Gradienten von 0,1 – 1,5 M NaCl (gelöst in Puffer A) in einem Vol von 30 ml eluiert. Durch eine Tricin-SDS-PAGE wurden die Fraktionen identifiziert, die Proteine im Bereich von 7 – 12 kDa enthielten. Diese Fraktionen wurden dann vereinigt, mit Puffer A verdünnt (zum Senken der NaCl-Konzentration auf ca. 0,1 M) und einer SP Sepharose-Chromatographie (4 ml Säulenvolumen) unterzogen. Nach der Elution des gebundenen Proteins mit 40 ml eines Gradienten von 0,1 – 1,5 M NaCl in Puffer A wurde wiederum eine Tricin-SDS-PAGE durchgeführt. Es konnten daraufhin 2 Fraktionen gefunden werden, die hohe Konzentrationen eines Proteins mit jeweils einer Größe von ca. 9 kDa enthielten (Abb. 3.9).

Um die beiden Proteine genauer zu Charakterisieren, wurde die N-terminale Aminosäuresequenz ermittelt, indem zunächst die Proteine von einem SDS-PA-Gel auf eine PVDF-Membran geblottet, dann angefärbt und schließlich aus der Membran herausgeschnitten wurden (s. 2.13.6). Die Sequenzierung erfolgte durch den hausinternen Service zur Proteinsequenzierung.

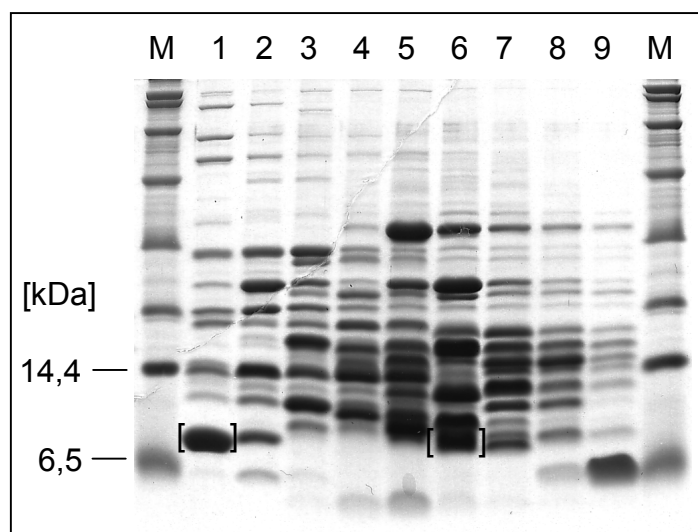


Abb. 3.9 Tricin-SDS-Proteingel (15 %) der Fraktionen aus der SP-Sepharose-Chromatographie. Es wurden die Fraktionen 1 – 9 sowie ein Molekulargewichtsmarker (M) aufgetragen. Die Proteinbanden, die zur N-terminalen Sequenzierung verwendet wurden, sind durch eckige Klammern markiert.

Der N-Terminus des 9 kDa-Proteins aus Fraktion 6 (Abb. 3.9) weist hohe Homologie zu dem 50S ribosomalen Protein L35 aus *Pseudomonas syringae* auf. Dagegen stimmen 26 bzw. 17 N-terminale Aminosäuren des 9 kDa-Proteins aus Fraktion 1 (Elution bei 0,3 M NaCl) überein mit den vorausgesagten Proteinprodukten der *hupB*- bzw. *hupN*-Gene aus *P. putida*. Damit war gezeigt, daß beide HU-Gene in *P. putida* exprimiert werden. Ein fehlendes Start-

Methionin in der N-terminalen Sequenz von HupN deutet darauf hin, daß in *P. putida* offenbar die erste Aminosäure von HupN abgespalten wird. Durch die sensitive Detektion der Aminosäuren bei der Sequenzierung war es möglich, in der HU-Protein-Präparation zwei verschiedene Sequenzen zu bestimmen. Darüber hinaus konnte sogar ein Konzentrationsunterschied für die einzelnen Aminosäurepeaks beobachtet werden, der darauf schließen läßt, daß das Verhältnis der Proteine HupB:HupN ca. 2:1 beträgt, also die Konzentration von HupB ungefähr doppelt so hoch ist wie die von HupN.

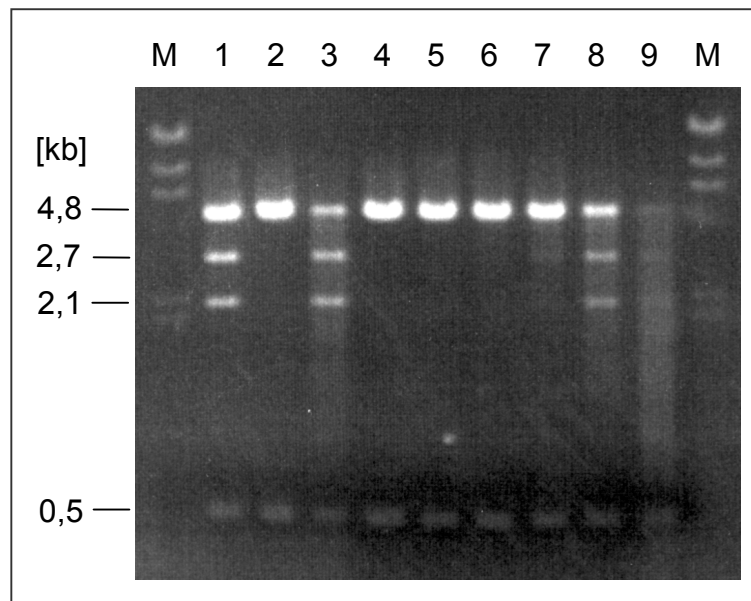


Abb. 3.10 *In vitro*-Rekombinationstests mit verschiedenen Verdünnungen der HU-Fraktion aus der SP-Sepharose-Chromatographie, aufgetragen auf ein Agarosegel (0,8 %). Die Größe der entstandenen Restriktionsfragmente sind links in kb dargestellt. M: Gewichtsmarker (λ -DNA verdaut mit *Hind*III), Spur 1: Positivkontrolle mit 200 nM HBSu, Spur 2: Negativkontrolle ohne HU, Spur 3: 200 nM HBSu gemischt mit einer 50fachen Verdünnung der HU-Fraktion, Spur 4 - 9: abnehmende Verdünnungen der HU-Fraktion (4: 2500fach, 5: 1000fach, 6: 500fach, 7: 250fach, 8: 100fach, 9: 5fach).

3.1.6 Untersuchung der Aktivität des nativen HU-Proteins

Da in der Fraktion 1 aus der SP-Sepharose-Chromatographie das HupB- und HupN-Protein gefunden wurden, sollte überprüft werden, ob diese Fraktion eine HU-spezifische Aktivität besitzt. Hierzu wurde der von Alonso *et al.* (1995) beschriebene Test verwendet, welcher auf der HU-vermittelten Rekombination durch das β -Protein an Rekombinationsstellen (*six sites*) beruht (s. 2.14.2). Findet Rekombination an dem als DNA-Substrat eingesetzten Plasmid pCB8 statt, entstehen zusätzliche Restriktionsfragmente, die in einem Agarosegel analysiert

werden können. Es wurden unterschiedliche Verdünnungen der HU-Fraktion in Reaktionspuffer verwendet. In Abb. 3. 10 ist zu sehen, daß eine 100fache Verdünnung der HU-Fraktion (Spur 8) Rekombination in ähnlicher Weise stimuliert wie die Positivkontrolle mit Hbsu, einem HU-homologen Protein aus *Bacillus subtilis*. In beiden Fällen waren zusätzliche Fragmente von 2,7 und 2,1 kb entstanden. Eine höhere Konzentration der HU-Fraktion im Ansatz führte allerdings zu einer Degradation der DNA (Spur 9), da möglicherweise ebenfalls DNase in der Fraktion enthalten war.

Da die Fraktion 1 aus der SP-Sepharose-Chromatographie HupB und HupN enthält und HU-spezifische Aktivität besitzt, ist es somit wahrscheinlich, daß HupB bzw. HupN HU aus *P. putida* darstellen.

3.1.7 Komplementation einer *Bacillus subtilis* *hbs*-Mutante durch *hupB* und *hupN*

In *Bacillus subtilis* ist das HU-homologe HBSu-Protein essentiell, und daher sind Mutationen in dem Hbsu-codierenden Gen *hbs*, die die Funktion des Proteins wesentlich beeinträchtigen, letal (Micka & Marahiel, 1992). *B. subtilis*-Zellen, die ein mutiertes HBSu-Protein mit 2 Aminosäureaustauschen (Phe47→Trp, Arg55→Ala) synthetisieren, haben Defizite bei der DNA-Reparatur, der homologen Rekombination und bei der β -Protein-abhängigen, sequenzspezifischen Rekombination, sind aber sonst lebensfähig (Fernandez *et al.*, 1997). Die Proteine HupB und HupN aus *P. putida* sind zu 53 % bzw. 43 % identisch zum HBSu-Protein. Um zu untersuchen, ob und in welchem Maß HupB und HupN die Funktion von HBSu komplementieren, wurden die *hupB*- bzw. *hupN*-Gene in die *B. subtilis*-Mutante gebracht, und die Zelle wurde dann einer DNA-schädigenden Substanz ausgesetzt.

Zunächst wurden jeweils *hupB* bzw. *hupN* in den Shuttle-Vektor pHP13 (Tab. 2.3) kloniert, welcher einen Replikationsursprung sowohl für *E. coli* als auch für *Bacillus* besitzt. Zur Klonierung wurde der Polylinker stromabwärts vom Chloramphenicol-Resistenzgen benutzt, so daß die Expression des in entsprechender Orientierung klonierten *hupB*- bzw. *hupN*-Gens durch den Cm^R-Promotor ermöglicht wird. pHP13 wurde zuerst mit *EcoRI* verdaut und das zurückgesetzte 3'-Ende wurde dann mit T4-Polymerase aufgefüllt, um Blunt Ends zu erzeugen. Anschließend wurde pHP13 mit *BamHI* für die Klonierung von *hupN* bzw. mit *HindIII* für die Klonierung von *hupB* verdaut. Ein *hupN*-Genfragment einschließlich stromaufwärts gelegener Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) wurde erhalten, indem pFBT12 (Tab. 2.3) mit *XbaI* und *BamHI* verdaut wurde, wobei nach dem *XbaI*-Verdau das 3'-Ende zum Blunt End aufgefüllt wurde. Durch eine Ligation dieses *hupN*-Genfragments mit dem entsprechend geschnittenem pHP13 (Blunt-*BamHI*) wurde das Plasmid pHP13-*hupN* erhalten. Ein *hupB*-Genfragment (ebenfalls mit RBS) wurde erzeugt, indem pFBT17 (Tab. 2.3) mit *XbaI* und *HindIII* geschnitten wurde, wobei wiederum das *XbaI*-Ende durch T4-Polymerase in ein Blunt End umgewandelt wurde. Durch Ligation des *hupB*-Fragments mit pHP13 (Blunt-*HindIII*) entstand das Plasmid pHP13-*hupB*.

Die Konstrukte wurden in den Stamm *B. subtilis* BG405 mit dem mutierten *hbs*-Gen (*hbs* 4755) transferiert und Zellen wurden dann in Kontakt mit 10 mM der DNA-schädigenden Substanz Methylmethansulfonat (MMS) gebracht. Entsprechend dem Protokoll von Fernandez *et al.* (1997) wurde anschließend die Zahl der überlebenden Zellen nach 15, 30 und 45 min Kontaktzeit mit MMS ermittelt. Als Kontrolle diente *B. subtilis* BG397 (Wildtyp-Stamm), *B. subtilis* BG405 mit pCB188 (enthält das *hbs* Wildtyp-Gen) und *B. subtilis* BG405 mit pHB13 (ohne Insert).

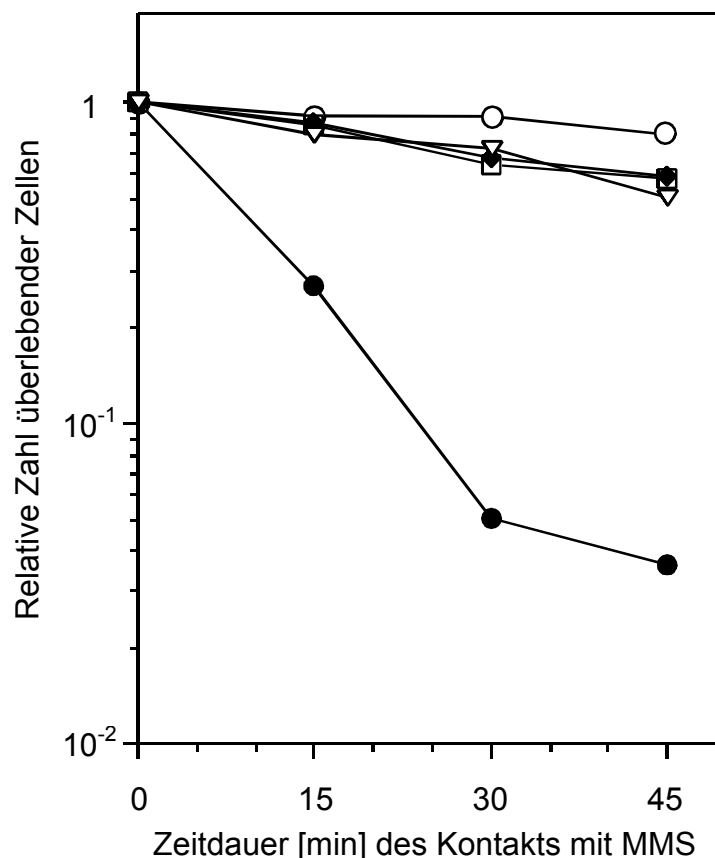


Abb. 3.11: Komplementation des mutierten *hbs*4755-Gens in *B. subtilis* BG405 durch *hupB* und *hupN*. Die relative Anzahl überlebender Zellen bezieht sich auf die Anzahl der Zellen (= 1) vor dem Kontakt mit Methylmethansulfonat (MMS). Die Symbole sind: ○ für Wildtyp-Stamm BG397, □ für BG405 (pCB188), ● für BG405 (pHP13), ▽ für BG405 (pHP13-*hupB*) und ◆ für BG405 (pHP13-*hupN*).

In Abb. 3.11 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Der Stamm BG405 mit pHB13 zeigt eine hohe Sensitivität gegen MMS, so daß nach 45 min nur noch 4 % (0,04 von 1) überlebende Zellen zu beobachten waren. Im Gegensatz dazu wurde der Wildtyp-Stamm (BG397) kaum durch den Effekt von MMS beeinträchtigt. Der Stamm BG405 mit pCB188, komplementiert

durch das Wildtyp-Gen *hbs* auf dem Plasmid, war ebenfalls resistent gegen MMS, wenn auch in etwas geringerer Weise als der Wildtyp-Stamm. *B. subtilis* BG405 transformiert mit dem Konstrukt pHP13-*hupB* bzw. pHP13-*hupN* zeigte in beiden Fällen eine ähnliche Resistenz gegen MMS wie BG405 komplementiert durch das Wildtyp-Gen *hbs* (auf pCB188). Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl HupB als auch HupN in der Lage sind, die fehlenden Funktionen der HBSu-Variante in *B. subtilis* zu ersetzen. Sie stellen damit beide, jedenfalls hinsichtlich ihrer Funktion in der zellulären DNA-Reparatur, voll funktionelle HU-Proteine dar.

3.1.8 Konstruktion von *hupB*- und *hupN*-Deletionsmutanten in *P. putida* KT2442 zur Untersuchung des Einflusses von HupB und HupN auf die Aktivierung des Ps1-Promotors

Da in HU⁻-Stämmen von *E. coli* die Aktivität von Ps1 signifikant geringer ist als in HU⁺-Stämmen, scheint HU die Aktivierung von Ps1 zu stimulieren (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). Da in *P. putida* KT2442 zwei HU-Proteine exprimiert werden, stellte sich die Frage, ob HupB, HupN oder beide Proteine zusammen diese Aktivierung von Ps1 in *P. putida* stimulieren. Um das zu untersuchen, wurde zunächst ein *P. putida* KT2442-Reporterstamm konstruiert, der eine Ps::*lacZ*-Fusion in Monocopy im Chromosom trägt. In diesen Stamm wurden dann *hupB*- und *hupN*-Deletionsfragmente durch homologe Rekombination ins Chromosom integriert, um die *hupB*- und *hupN*-Wildtypallele auszuschalten und so die Synthese von HupB bzw. HupN zu verhindern. Schließlich wurde in diesen Deletionsmutanten die Aktivität von Ps1 im induzierten und nicht-induzierten Zustand gemessen.

3.1.8.1 Konstruktion eines Ps::*lacZ*-Reporterstammes von *P. putida* KT2442

Das Plasmid pTK19 (Tab. 2.3) enthält ein 2,4 kb großes *HpaI*-Fragment des TOL-Plasmids pWW0, auf dem sich das komplette *xylR*-Gen einschließlich des Pr-Promotors sowie der Ps-Promotor des benachbarten, aber gegenläufig orientierten *xylS*-Gens befinden, während das *xylS*-Gen selbst nicht auf dem Fragment enthalten ist. Das *HpaI*-Fragment wurde durch Blunt End-Ligation in die *SmaI*-Schnittstelle von Plasmid pUJ8 kloniert, das ein *lacZ*-Gen mit RBS besitzt. In richtiger Orientierung bildet das *HpaI*-Fragment mit pUJ8 eine transkriptionelle Ps::*lacZ*-Fusion, was zur Blaufärbung von Fragment-enthaltenden Bakterienkolonien auf LB-Platten mit X-Gal führt. Aus dem resultierenden Plasmid wurde dann das gesamte *xylR*-Ps::*lacZ*-Konstrukt als 6,5 kb großes *NotI*-Fragment herausgeschnitten und in die *NotI*-Schnittstelle von pUT mini-Tn5-Tel kloniert. pUT mini-Tn5-Tel ist ein Transposon-Vektor zur Integration von DNA ins bakterielle Chromosom und repliziert nur in Stämmen, die das π -Protein synthetisieren, z. B. CC118 λ pir (De Lorenzo & Timmis, 1994). Das resultierende pUT mini-Tn5-Tel-*[xylR*-Ps::*lacZ*]-Konstrukt wurde in CC118 λ pir transformiert, und die

entsprechenden rekombinanten Klone bildeten blau-schwarze Kolonien auf LB-Platten mit X-Gal und Tellurit.

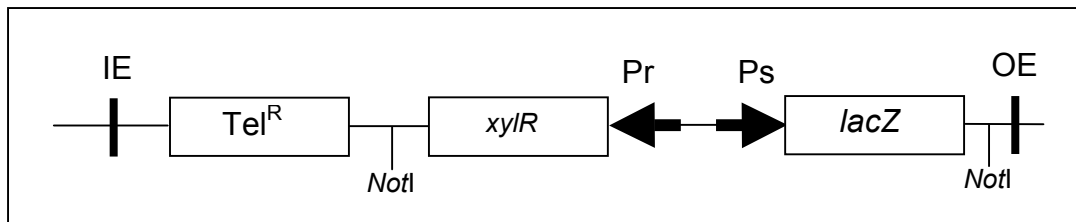


Abb. 3.12: Schematische Darstellung des in das Chromosom von *P. putida* KT2442 inserierten Konstrukts. Je nach Orientierung der Ps::*lacZ*-Fusion kann die Tellurit-Resistenz (*Tel^R*) sowohl stromabwärts vom *lacZ*-Gen als auch stromaufwärts vom *xyIR*-Gen lokalisiert sein. IE (Inside End) und OE (Outside End) sind die zur Transposition notwendigen Sequenzen (19 bp) des IS50R aus dem Tn5.

Um anschließend das *xyIR*-Ps::*lacZ*-Fragment mit der Tellurit-Resistenz stabil in das Chromosom von KT2442 zu inserieren (s. Abb. 3.12), wurde ein triparentales Mating (s. 2.8.3) mit dem pUT-Konstrukt in CC118 λ pir, dem Helferstamm HB101 (pRK600) und *P. putida* KT2442 angesetzt. Nach einer Inkubation ÜN bei 30 °C wurde der Ansatz auf M9 Minimalmedium-Platten mit Rif⁵⁰, Tel⁴⁰, 0,1 % (w/v) Casamino Acids und 5 mM Benzoat ausplattiert. Benzoat diente hier zur Selektion auf *P. putida* KT2442, da als einziger der drei Mating-Partner nur dieser Stamm auf Benzoat wachsen kann.

Als nächstes wurden die gewachsenen Klone auf ihre Eigenschaft hin getestet, in β -Galactosidase-Tests (β -Gal-Tests) einen möglichst großen Unterschied in der Aktivität von nicht-induzierten zu induzierten Zellen zu zeigen. Die Bedingungen für die Tests wurden wie bei Holtel *et al.* (1994) beschrieben gewählt, d. h. es wurden ÜN-Kulturen in M9-Minimalmedium mit Rif⁵⁰, 15 mM Succinat und 0,2 % (w/v) Casamino Acids verdünnt (1:50), die bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert wurden. Dann wurden bei den unter induzierten Bedingungen zu testenden Kulturen 5 mM Benzylalkohol zugegeben und alle Kulturen wurden weitere 3 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. In dem Minimalmedium diente Succinat als C-Quelle, da hierbei der Ps1-Promotor keiner C-Quellen-abhängigen Inhibition unterliegt, welche aber beispielsweise bei Glucose auftritt (Holtel *et al.*, 1994). Nach Durchführung der β -Gal-Tests (s. 2.15.1) in Dreifachbestimmungen wurde ein *P. putida* KT2442 Ps::*lacZ*-Klon gefunden, bei dem unter nicht-induzierenden Bedingungen 57 Units und unter induzierenden Bedingungen 1152 Units gemessen wurden.

3.1.8.2 Konstruktion von *hupB*- und *hupN*-Deletionsmutanten von *P. putida* KT2442

Zur Inaktivierung von *hupB* bzw. *hupN* in dem *P. putida*-Reporterstamm wurden jeweils Teile dieser Gene deletiert. Um dies zu erreichen, wurden durch PCR Deletionsfragmente hergestellt, die dann mittels homologer Rekombination in das Chromosom des Reporterstammes inseriert wurden und so das intakte Wildtypallel eliminierten.

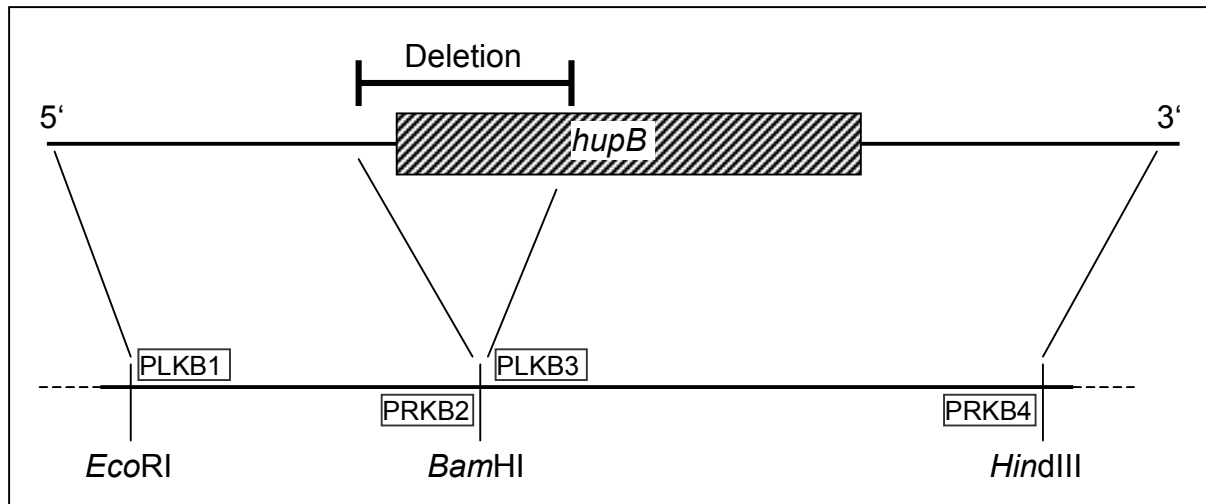


Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Konstruktion des *hupB*-Deletionsfragments. Oben: das *hupB*-Wildtyp-Gen, der Bereich der Deletion ist markiert. Unten: Das aus zwei PCR-Fragmenten mit den Schnittstellen *EcoRI*-*Bam*HI und *Bam*HI-*Hind*III zusammengesetzte Deletionsfragment. Die zur Amplifikation der Fragmente verwendeten Primer sind eingerahmt.

Das *hupB*-Deletionsfragment (s. Abb. 3.13) setzte sich aus 2 PCR-Fragmenten zusammen und enthielt im Vergleich zur entsprechenden Region des Wildtyps eine Deletion von 224 bp. Deletiert wurden die 35 bp stromaufwärts vom *hupB*-Startcodon (einschließlich der RBS) sowie die ersten 189 bp von *hupB* (entsprechend 63 AS des N-Terminus von HupB). Die Länge des gesamten Deletionsfragments einschließlich der eingefügten Stop-Codons und Restriktionsschnittstellen betrug 930 bp und umfaßte den Bereich von 474 bp stromaufwärts und 386 bp stromabwärts von *hupB*. Die Länge der entsprechenden Region aus dem Wildtyp beträgt somit 1133 bp. Die beiden Teilfragmente wurden durch PCR erzeugt, in denen Plasmid-DNA von pFBT8 als Template diente. Zur Amplifikation des ersten Fragments mit den endständigen Restriktionsschnittstellen *EcoRI*-*Bam*HI wurden die Primer PLKB1 und PRKB2 bei $T_a=60^\circ\text{C}$ verwendet. Das zweite PCR-Fragment mit den endständigen Schnittstellen *Bam*HI-*Hind*III wurde mit den Primern PLKB3 und PRKB4 bei $T_a=60^\circ\text{C}$ amplifiziert. Die Primer PRKB2 und PLKB3 wurden in der Weise konstruiert, daß stromauf- und stromabwärts von der verbindenden *Bam*HI-Schnittstelle jeweils ein Stopcodon im *hupB*-Leseraster eingefügt wurde. Nach dem Verdau durch die geeigneten Restriktionsenzyme

wurden die Teilfragmente nacheinander in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pUC18Not kloniert. pUC18Not ist ein Klonierungsvektor, der es erlaubt, ein in den Polylinker kloniertes Insert als *NotI-NotI*-Fragment herauszuschneiden (Tab. 2.3). Das resultierende Plasmid enthielt das gesamte, zusammengesetzte Deletionsfragment, welches dann als einzelnes *NotI*-Fragment in die entsprechende Schnittstelle des Vektors pKNG101 kloniert wurde. Der Suicide-Vektor pKNG101 dient einerseits zur chromosomalen Insertion von DNA-Fragmenten durch homologe Rekombination und andererseits zur positiven Selektion von Transkonjuganden. Das resultierende Plasmid wurde als pKNG101- $\Delta hupB$ bezeichnet.

Die Konstruktion eines *hupN*-Deletionsfragments erfolgte in der gleichen Weise wie bereits für das *hupB*-Deletionsfragment beschrieben. Das *hupN*-Gen aus *P. putida* ist auf einem 686 bp großen, chromosomalen *EcoRI-SmaI*-Fragment lokalisiert (Nakazawa *et al.*, 1993). In dem wiederum aus 2 PCR-Fragmenten zusammengesetzten Deletionsfragment ist ein Bereich von 31 bp, einschließlich der RBS (insgesamt 17 bp stromaufwärts von *hupN*) und den ersten 14 bp vom 5'-Ende der *hupN*-codierenden Region, deletiert. Die Primer PLKN1 und PRKN2 für das *EcoRI-BamHI*-Fragment sowie die Primer PLKN3 und PRKN4 für das *BamHI-HindIII*-Fragment wurden zur Amplifikation in zwei PCRs bei $T_a=60$ °C und mit genomischer DNA von *P. putida* KT2442 als Template verwendet. Die mit geeigneten Restriktionsenzymen verdauten PCR-Produkte wurden nacheinander in die entsprechenden Schnittstellen von pUC18Not kloniert, so daß sich ein zusammengesetztes *hupN*-Deletionsfragment von 672 bp ergab. Aus dem resultierenden Plasmid wurde das Deletionsfragment anschließend als *NotI*-Fragment herausgeschnitten und in die *NotI*-Schnittstelle von pKNG101 kloniert, das dann als pKNG101- $\Delta hupN$ bezeichnet wurde.

Der Wirtstamm für die Deletionen in den chromosomalen Genen *hupB* und *hupN* war der zuvor konstruierte Reporterstamm von *P. putida* KT2442. Dieser besitzt eine *Ps::lacZ*-Fusion mit einer Tellurit-Resistenz als Selektionsmarker im Chromosom und ist damit geeignet, den Effekt von Deletionen in *hupB* bzw. *hupN* auf die Aktivität des *Ps1*-Promotors zu bestimmen. Zur Erzeugung von chromosomalen Deletionen wurde der Vektor pKNG101 verwendet, da er im Wirtstamm (*P. putida* KT2442) nicht replizieren kann und Selektionsmarker zur positiven Selektion von Transkonjuganden bzw. erfolgreiche Mutanten besitzt (Kaniga *et al.*, 1991). Die Insertion des gesamten Plasmids ins Chromosom (Cointegrat-Bildung) durch homologe Rekombination bewirkt, daß die Zelle Streptomycinresistenz, gleichzeitig aber auch Sensitivität gegen 5 – 7 % (w/v) Saccharose erwirbt. Dadurch wird im zweiten Schritt die Selektion von Zellen, bei denen das Plasmid durch Excision aus dem Chromosom wieder entfernt wurde, indem ein Austausch zwischen Wildtyp- und Deletionsallel stattfand (Doppelcrossover), erleichtert, weil nur solche Rekombinanten auf LB-Platten mit 7 % (w/v) Saccharose wachsen können.

Zunächst wurden jeweils die Plasmide pKNG101- $\Delta hupB$ und pKNG101- $\Delta hupN$ durch

Konjugation in den Reporterstamm transferiert. Hierzu wurde ein triparentales Mating mit den Stämmen CC118 λ pir (pKNG101- $\Delta hupB$) bzw. CC118 λ pir (pKNG101- $\Delta hupN$), dem Helferstamm HB101 (pRK600) und dem Reporterstamm *P. putida* KT2442 Ps::*lacZ* durchgeführt und die Ansätze wurden auf LB-Platten mit Rif⁵⁰, Tel⁴⁰ und Sm¹⁰⁰ ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden dann für ca. 24 h in Flüssig-LB-Medium ohne Antibiotika bei 30 °C inkubiert und dann auf LB-Platten mit Rif⁵⁰, Tel⁴⁰ und 7 % (w/v) Saccharose ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Dieser Schritt diente zur Selektion von Zellen, die das integrierte Plasmid durch ein zweites Crossing-over verloren haben und damit auch die auf dem Plasmid codierte Streptomycinresistenz und Saccharosesensitivität.

Angewachsene Klone wurden mittels PCR auf die korrekte Deletion hin untersucht. Das Primerpaar PLKOB5 und PRKOB7 diente zur Analyse der *hupB*-Deletion, wobei das PCR-Produkt im Wildtypstamm 704 bp und in der Deletionsmutante 451 bp groß ist (Abb. 3.14). Zur Analyse der *hupN*-Deletion wurden die Primer PLKON5 und PRKON6 verwendet und die Größe des entsprechenden PCR-Produkts beträgt im Wildtypstamm 320 bp, in der *hupN*-Deletionsmutante 299 bp (Abb. 3.14).

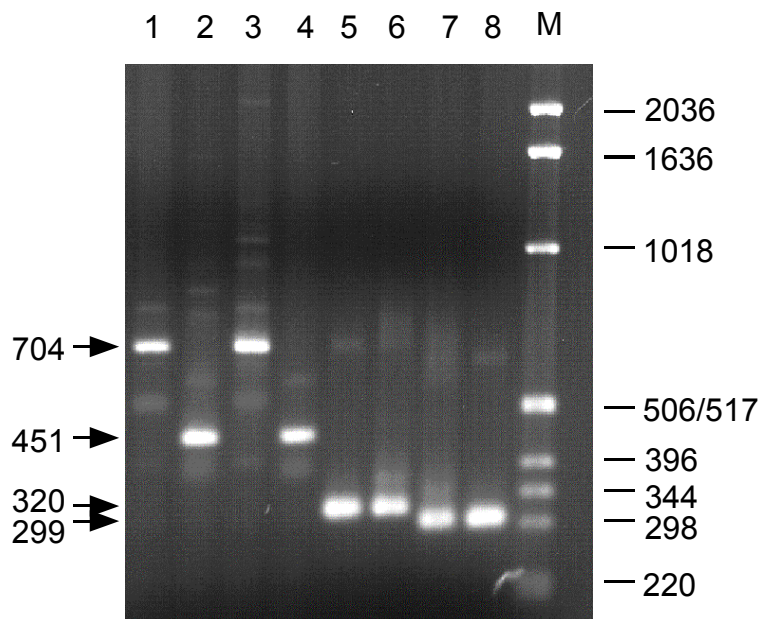


Abb. 3.14: Überprüfung der chromosomalen *hupB*- und *hupN*-Deletionen in verschiedenen *P. putida* KT2442-Mutanten durch PCR in einem 2 %igen Agarosegel. Rechts sind die Fragmentgrößen des Gewichtsmarkers (Spur M, 1-kb-Leiter) in bp dargestellt. Links sind die Größen der PCR-Produkte in bp angegeben. Durchgeführt wurden die PCR-Reaktionen in Spur 1-4 mit den Primern PLKOB5 und PRKOB7 zur Analyse der *hupB*-Deletion und in Spur 5-8 mit den Primern PLKON5 und PRKON6 zur Analyse der *hupN*-Deletion. Folgende Stämme wurden untersucht: *P. putida* KT2442 Ps::*lacZ* (Spur 1 und 5), KT2442 Ps::*lacZ* $\Delta hupB$ mit pFBT22 (Spur 2 und 6), KT2442 Ps::*lacZ* $\Delta hupN$ (Spur 3 und 7) und KT2442 Ps::*lacZ* $\Delta hupBN$ mit pFBT22 (Spur 4 und 8). In Spur 4 wurde keine zusätzliche *hupB*-

Wildtyp-Bande (704 bp) erhalten, da die Primer PLKOB5 und PRKOB7 außerhalb des *hupB*-Gens auf dem Chromosom hybridisieren und nicht auf dem Plasmid pFBT22, welches nur die *hupB*-kodierende Region enthält.

3.1.8.3 Eine *hupB/hupN*-Doppelmutante scheint nicht lebensfähig zu sein

Zur Konstruktion der *hupB/hupN*-Doppeldeletionsmutante wurde zunächst die gleiche Strategie verwendet wie bei der Erzeugung der jeweils einzelnen Deletionsmutationen. Hierbei wurden beide möglichen Verfahrensweisen angewendet, d.h. durch Konjugation wurde zum einen das Plasmid pKNG101- Δ *hupN* in die *P. putida* KT2442 Δ *hupB*-Mutante und zum anderen das Plasmid pKNG101- Δ *hupB* in die *P. putida* KT2442 Δ *hupN*-Mutante transferiert. In beiden Fällen konnten keine Doppeldeletionsmutanten durch PCR gefunden werden, obwohl mehrere 100 Klone analysiert wurden. Im Vergleich dazu konnte bei der Herstellung der einfachen Deletionsmutanten 1 positiver Klon zwischen 10 untersuchten gefunden werden.

Eine zweite Strategie zur Konstruktion der *hupB/hupN*-Doppeldeletionsmutante wurde anschließend angewendet, bei der das Plasmid pKNG101- Δ *hupN* in die *P. putida* KT2442 Δ *hupB*-Mutante, die allerdings ein Plasmid mit einem funktionsfähigen *hupB*-Gen (pFBT22, siehe unten sowie Tab. 2.3) enthält, transferiert wird. Die Δ *hupB*-Mutante mit dem *hupB*-Plasmid ist also mit den gleichen Proteinen ausgestattet wie der Wildtypstamm und eine Deletion in *hupN* sollte demnach ebenso leicht herzustellen sein. In einem weiteren Schritt sollte dann auf Zellen selektiert werden, die das *hupB*-Plasmid verloren haben.

Um die spätere Selektion auf einen Klon ohne *hupB*-Plasmid zu erleichtern, wurde zur Konstruktion von pFBT22 ein *xylE*-Gen in das *hupB*-Expressionsplasmid pFBT18 (Km^R, Tab. 2.3) kloniert. Hierzu wurde pXYLE1 (Tab. 2.3) mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und das entstandene 960 bp große *xylE*-Fragment wurde mit pFBT18 ligiert, welches zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurde. Das resultierende Plasmid pFBT22 wurde anschließend in *P. putida* KT2442 Δ *hupB* transferiert. Die Präsenz von pFBT22 in den Zellen konnte dann durch Besprühen der Platten mit einer 0,1 M Brenzcatechin-Lösung überprüft werden, wobei sich pFBT22-positive Kolonien gelb färbten. Das gelbe Reaktionsprodukt 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd entsteht aus der Umwandlung von Brenzcatechin durch die von *xylE* codierte Catechol-2,3-Dioxygenase. Als nächstes wurde durch ein triparentales Mating pKNG101- Δ *hupN* in *P. putida* KT2442 Δ *hupB* (pFBT22) transferiert und der Ansatz auf LB-Platten mit Rif⁵⁰, Tel⁴⁰, Sm¹⁰⁰ und Km⁵⁰ ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden dann einzelne Kolonien für ca. 24 h in Flüssig-LB-Medium ohne Antibiotika bei 30 °C inkubiert und dann auf LB-Platten mit Rif⁵⁰, Tel⁴⁰, Km⁵⁰ und 7 % (w/v) Saccharose ausplattiert und wieder bei 30 °C inkubiert. Es konnten auf diese Weise Klone erhalten werden, die, analysiert durch PCR (Abb. 3.14), Deletionen in sowohl dem chromosomalen *hupB*- als auch im chromosomalen *hupN*-Gen aufwiesen, die aber alle wegen

der Präsenz von pFBT22 gelbe Kolonien nach Besprühen mit Brenzcatechin bildeten.

Im folgenden Schritt wurde versucht, das Plasmid pFBT22 aus der Doppelmutante zu entfernen, um einen $HupB^-/HupN^-$ -Stamm zu erhalten. Hierzu wurde KT2442 $Ps::lacZ \Delta hupB \Delta hupN$ (pFBT22) für mehrere Generationen in nicht-selektiven LB-Medium (ohne Antibiotika) inkubiert und dann auf LB-Platten (ohne Antibiotika) ausplattiert und ÜN inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag mit Brenzcatechin besprüht, wonach nur gelbe, also pFBT22 enthaltende, Kolonien erhalten wurden. Um zu überprüfen, ob ein anderer Stamm, der nur eine Deletion in *hupB* aufweist, das Plasmid pFBT22 verlieren kann, wurde der Verlust des Plasmids aus KT2442 $Ps::lacZ \Delta hupB \Delta hupN$ (pFBT22) im Vergleich zu KT2442 $Ps::lacZ \Delta hupB$ (pFBT22) nach verschiedenen Zeiten gemessen.

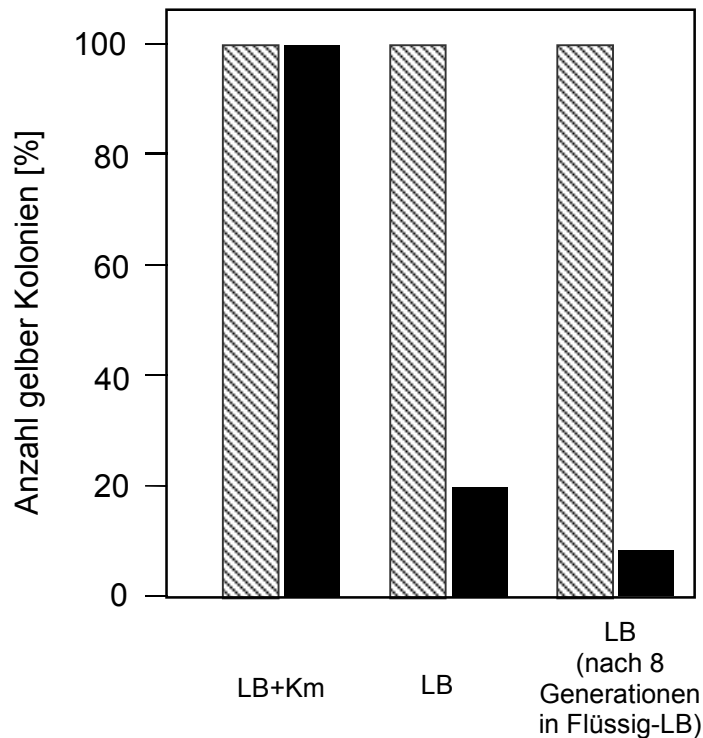


Abb. 3.15: Verlust des Plasmids pFBT22 der Stämme *P. putida* KT2442 $Ps::lacZ \Delta hupB \Delta hupN$ (pFBT22) (schraffierte Säulen) und KT2442 $Ps::lacZ \Delta hupB$ (pFBT22) (schwarze Säulen). Beide Stämme wurden auf LB-Platten mit Km^{50} (LB+Km), auf LB-Platten ohne Antibiotika (LB) und auf LB-Platten ohne Antibiotika nach vorherigem Wachstum in LB-Flüssigmedium (LB (nach 8 Generationen in Flüssig-LB)) ausplattiert und ÜN bei 30 °C inkubiert. Bestimmt wurde die Anzahl gelber, also pFBT22 enthaltender, Kolonien nach Besprühen mit Brenzcatechin.

Wie in Abb. 3.15 zu sehen ist, waren nach Wachstum auf Selektivmedium (LB-Platten mit Km^{50}) und Besprühen mit Brenzkatechin bei beiden Stämmen nur gelbe Kolonien zu sehen, d.h. alle Kolonien (100 %) besaßen das Plasmid. Wurden beide Stämme auf LB-Platten ohne

Antibiotika ausplattiert, behielten 100 % der Kolonien der *hupB/hupN*-Doppelmutante aber nur 20 % der Kolonien der *hupB*-Mutante das Plasmid. Wurden vor dem Ausplattieren auf LB-Medium zusätzlich beide Stämme für 8 Generationen in LB-Flüssigmedium ohne Antibiotika inkubiert, behielten wiederum 100 % der Kolonien der *hupB/hupN*-Doppelmutante das Plasmid, während nur noch 8 % der Kolonien der *hupB*-Mutante das Plasmid enthielten.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass nur Mutanten von *P. putida* KT2442 wachsen können, die mindestens ein funktionsfähiges *hup*-Gen enthalten. Aus diesem Grund kann pFBT22 nicht aus der *hupB/hupN*-Doppelmutante entfernt werden, weil in diesen Zellen nur das Plasmid ein *hup*-Gen enthält. Somit scheint der Verlust von *hupB* und *hupN* für *P. putida* offenbar letal zu sein.

3.1.8.4 Effekt der *hupB*- bzw. *hupN*-Deletionen auf die Ps1-Promotoraktivität in *P. putida* KT2442

Zur Aktivierung des σ^{54} -abhängigen Ps1-Promotors ist das σ^{54} -RNA-Polymerase-Holoenzym und das seinerseits durch einen Effektor aktivierte XylR Aktivator-Protein notwendig. Stimuliert wird die Aktivierung weiterhin durch HU, das bei dem Aufbau einer bestimmten Protein-DNA-Architektur beteiligt ist, um das stromaufwärts gebundene XylR-Protein in Kontakt mit der RNA-Polymerase zu bringen (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a).

Der in dieser Arbeit konstruierte *P. putida*-Reporterstamm besitzt eine Ps1::lacZ-Fusion sowie das *xylR*-Gen mit seinem natürlichen Promotor in monocopy. In diesem Stamm wurden Deletionen in den Genen *hupB* und *hupN* eingefügt (s. 3.1.8.2) und der Effekt dieser Deletionen bzw. der Einfluß von HupB und HupN auf die Ps1-Aktivität wurde nun durch β -Gal-Tests unter nicht-induzierenden und induzierenden Bedingungen bestimmt (s. 3.1.8.1).

Wie in Abb. 3.16 zu sehen ist, zeigte die *hupN*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp (bezogen auf *hupB* bzw. *hupN*) eine leicht höhere Ps1-Aktivität nach Induktion mit Benzylalkohol und hat damit wohl nur einen geringen Effekt auf Ps1. Im Gegensatz dazu zeigte die *hupB*-Deletionsmutante eine um ca. 30 % geringere Ps1-Aktivität als der Wildtyp. Daher wird die Ps1-Aktivität stärker von HupB stimuliert als von HupN, wenn vorausgesetzt wird, daß die Expression von *hupB* bzw. *hupN* in den entsprechenden Deletionsmutanten ungefähr gleich ist.

Da es nicht möglich war, eine *hupB/hupN*-Doppeldeletionsmutante zu erzeugen konnte letztlich nicht bestimmt werden, wie hoch die Ps1-Aktivität in einer *P. putida* HU⁻-Mutante ist.

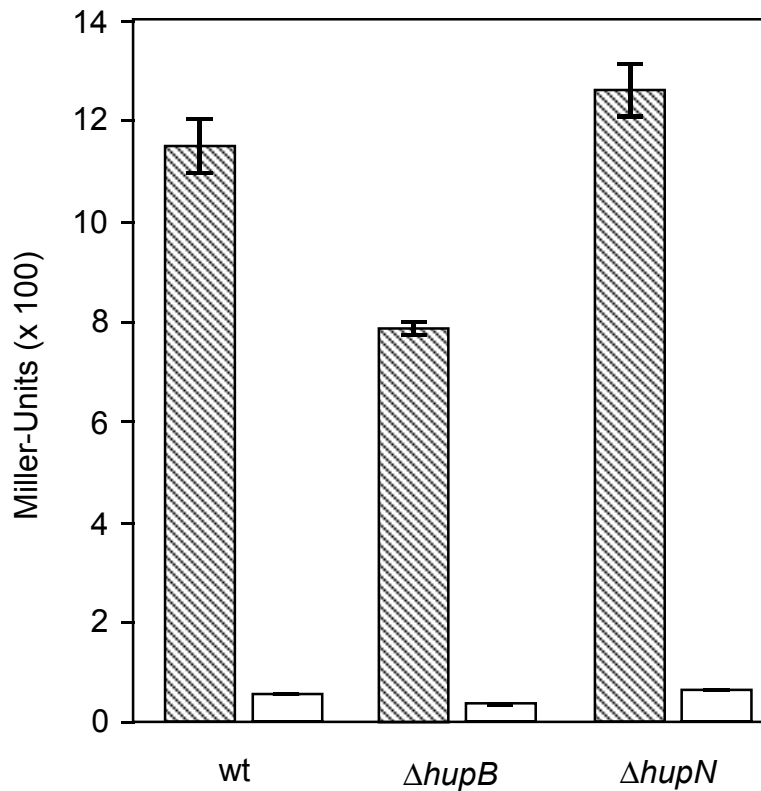


Abb. 3.16: Effekt von Deletionen in den Genen *hupB* und *hupN* auf die Ps1-Promotoraktivität. Gemessen wurde die β -Galactosidaseaktivität in den Stämmen *P. putida* KT2442 Ps::lacZ (wt), KT2442 Ps::lacZ $\Delta hupB$ ($\Delta hupB$) und KT2442 Ps::lacZ $\Delta hupN$ ($\Delta hupN$) von jeweils 3 parallelen Ansätzen unter nicht-induzierenden Bedingungen (weiße Säulen) und induzierenden Bedingungen (schraffierte Säulen). Die Fehlerbalken repräsentieren den mittleren Fehler des Mittelwertes aus 3 Messungen.

3.2 Aufreinigung und Charakterisierung von HupB und HupN

P. putida gehört neben *P. aeruginosa*, wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben, zu den Eubakterien, die neben den Enterobakterien zwei verschiedene Gene exprimieren, die für HU-Proteine codieren. Um einerseits testen zu können, ob sich die isolierten HU-Proteine aus *P. putida*, HupB und HupN, generell in ihrer Aktivität unterscheiden, und um andererseits diese Proteine später dann in *in vitro*-Transkriptionsassays hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Aktivierung der Promotoren Pu und Ps1 untersuchen zu können, wurden sie jeweils in *P. putida* überexprimiert und dann aufgereinigt.

3.2.1 Konstruktion von *P. putida*-Stämmen zur Überexpression von *hupB* und *hupN*

Um zunächst zu überprüfen, ob die Überexpression von *hupB* und *hupN* ohne weiteres möglich ist und zu löslichen Proteinen führt, wurden die Gene jeweils in die P_{T7}-Expressionsvektoren pT7-7 und pET-3d (Tab. 2.3) kloniert. Die Vektoren besitzen stromabwärts von einer starken SD-Sequenz eine *NdeI*- bzw. *NcoI*-Schnittstelle, so daß das Startcodon des zu exprimierenden Gens an eine für die Expression optimale Position gebracht wird.

Für die Klonierung in pT7-7 wurde durch PCR ein *hupB*-Fragment hergestellt, das innerhalb des Startcodons von *hupB* eine *NdeI*-Schnittstelle und stromabwärts vom Stopcodon eine *BamHI*-Schnittstelle besitzt. Hierzu wurde das Primerpaar PLHU1N und PRHU1B bei einer T_a von 55 °C und pFBT8-DNA (Plasmid mit einem *hupB*-enthaltenden, chromosomalen Fragment aus *P. putida*, s. 3.1.1) als Template verwendet. Das PCR-Fragment wurde zunächst in pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert (pFBT14) und daraus dann als ca. 300 bp großes *NdeI*-*BamHI*-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen von pT7-7 ligiert. Das resultierende Plasmid pFBT17 wurde anschließend in Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) transferiert, um die Expression von *hupB* zu überprüfen. Zwei Kulturen von BL21 (DE3) (pFBT17) wurden in LB-Medium angesetzt und eine davon wurde mit 1 mM IPTG induziert. Von beiden Kulturen wurden klare Zellextrakte hergestellt (s. 2.13), und das Pellet nach der Zentrifugation des Rohextraktes wurde aufbehalten. Zur Analyse der *hupB*-Expression wurde dann eine Tricin-SDS-PAGE durchgeführt, wobei von beiden Kulturen der klare Extrakt sowie etwas Pellet gelöst in Ladepuffer aufgetragen wurde. Hierbei zeigte sich, daß HupB (ca. 9 kDa auf dem Gel) in den Zellen in hoher Konzentration und hauptsächlich als lösliches Protein vorlag. Eine geringe Menge HupB befand sich in der unlöslichen Fraktion (Pellet) des Rohextraktes.

Für die Klonierung von *hupN* in pET-3d wurde ein *hupN*-Fragment durch eine PCR mit den Primern PLNAK3 und PRNAK4 bei T_a=50 °C und genomischer DNA von *P. putida* KT2442 als Template durchgeführt. Wie im Falle des *hupB*-Fragments (s. o.) besitzt das *hupN*-Fragment eine *NcoI*-Schnittstelle im Startcodon und eine *BamHI*-Schnittstelle stromabwärts vom Stopcodon von *hupN*. Das ca. 300 bp große PCR-Fragment wurde zunächst wieder in pCR2.1 kloniert, als *NcoI*-*BamHI*-Fragment aus dem resultierenden Plasmid (pFBT10) herausgeschnitten und schließlich in die entsprechenden Schnittstellen von pET-3d inseriert. Das resultierende Plasmid mit der Bezeichnung pFBT12 wurde dann in BL21 (DE3)-Zellen transferiert, um die Expression von *hupN* zu überprüfen (s. o.). Auch hierbei wurde eine hohe Expression von *hupN* beobachtet, und das Proteinprodukt HupN (ca. 9 kDa) befand sich hauptsächlich in der löslichen Fraktion.

Da die Synthese von HupB bzw. HupN in *E. coli* zu einer Verunreinigung der *P. putida*-Proteine mit den homologen Proteinen des *E. coli*-Wirtsstammes führt, wurde die Überexpression von *hupB* und *hupN* in *P. putida* KT2442-Stämmen durchgeführt. Hierzu mußten die *hup*-Gene mit jeweils der SD-Sequenz aus den P_{T7}-Expressionsvektoren in den „broad host range“-Vektor pVLT33 umklont werden, welcher einen mit IPTG induzierbaren P_{tac}-Promotor besitzt. Die beiden Plasmide pFBT12 und pFBT17 wurden zunächst mit *Xba*I geschnitten und die zurückgesetzten 3'-Enden wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Ein anschließender Verdau mit *Bam*HI führte zu ca. 340 bp großen Fragmenten, welche *hupB* bzw. *hupN* mit den SD-Sequenzen aus den P_{T7}-Vektoren enthielten. Vektor pVLT33 wurde vorbereitet, indem er mit *Eco*RI geschnitten, dann mit Klenow-Enzym behandelt und schließlich mit *Bam*HI verdaut wurde. Die *hup*-Fragmente wurden dann jeweils durch Blunt End- Sticky End-Ligation in pVLT33 kloniert. Das entstandene *hupN*-Expressionsplasmid (pFBT16) wurde durch Elektroporation in *P. putida* KT2442 transferiert. Die Analyse der *hupN*-Expression ergab, daß HupN in so großer Menge synthetisiert wird, daß nach der Aufreinigung die Verunreinigung mit nativen HupB vernachlässigt werden konnte. Im Gegensatz dazu war die Expression von *hupB* (mit pFBT18) in KT2442 geringer, so daß Verunreinigungen mit nativem HupN in einer HupB-Präparation signifikant werden konnten. Aus diesem Grund wurde pFBT18 in die in der Zwischenzeit konstruierte *hupN*-Deletionsmutante von *P. putida* KT2442 (s. 3.1.8.2) als Produktionsstamm transferiert, um so die Kontamination mit nativem, chromosomal codiertem HupN ganz auszuschließen.

3.2.2 Aufreinigung von HupB und HupN

Die einzelnen Schritte des Aufreinigungsprotokolls sind unter 2.13.1.1 beschrieben.

Für die Aufreinigung von HupN wurde eine 4 l-Kultur von *P. putida* KT2442 (pFBT16) in LB-Medium mit Km⁵⁰ angezogen. Von den geernteten Zellen (18 g Naßgewicht) wurde entsprechend dem Protokoll ein klarer Extrakt hergestellt, der dann einer Ammoniumsulfat-Fraktionierung unterzogen wurde. Eine 4 ml-Heparinsäule wurde gepackt (s. 2.13.2.1) und die insgesamt 40 ml Proteinlösung aus der Fraktionierung wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule gegeben. Nachdem die Säule so lange mit Startpuffer (Puffer A, s. 2.13.1.1) gespült wurde, bis kein Protein mehr von der Säule gewaschen wurde, wurde ein 80 ml Salzgradient von 0,1 – 1,7 M NaCl in Startpuffer (60 ml von 0,1 bis 1,0 M und 20 ml von 1,0 bis 1,7 M NaCl) bei 1 ml/min auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml aufgefangen, welche anschließend in einer Tricin-SDS-PAGE analysiert wurden. Es stellte sich dabei heraus, daß HupN in den Fraktionen 19 – 25 (entspricht 0,55 – 0,75 M NaCl) in hoher Konzentration und bereits zu über 95 % rein vorlag, so daß kein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig war. Die Reinheit dieser HupN-Präparation wurde zusätzlich durch N-terminale Sequenzierung überprüft. Das Ergebnis der HupN-Reinigung ist in dem

Tricin-SDS-Gel der Abb. 3.17 zu sehen. Insgesamt enthielten die Fraktionen 19 –25 ca. 10 mg Protein. Die HupN-Fractionen wurden vereinigt, gegen Startpuffer dialysiert und anschließend mit einem gleichen Vol. 87 % (v/v) Glycerin versetzt und bei –20 °C eingefroren.

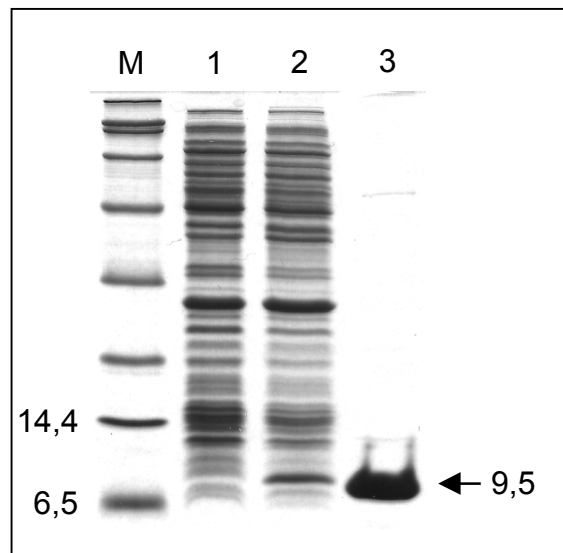


Abb. 3.17: HupN-Aufreinigung. Auf dem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel ist in Spur 1 ein Extrakt der nicht-induzierten Zellen von KT2442 (pFBT16), in Spur 2 ein Extrakt der induzierten Zellen von KT2442 (pFBT16) und in Spur 3 das HupN-Protein nach der Heparin-Chromatographie zu sehen. Der Molekulargewichtsstandard ist in Spur M dargestellt, daneben die Größe (in kDa) der kleinsten Standardproteine. Links die auf Basis der Aminosäuresequenz berechnete Größe von HupN in kDa.

Für die Aufreinigung von HupB wurden 5 l einer Kultur von *P. putida* KT2442 $\Delta hupN$ (pFBT18) in LB-Medium mit Km^{50} angezogen. Nach dem Herstellen eines Zellextraktes aus den 13 g Biomasse (Naßgewicht) und der Ammoniumsulfat-Fraktionierung wurden die resultierenden 35 ml Proteinlösung auf eine 5 ml Heparin-Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule wurde zur Elution des gebundenen Proteins ein 80 ml NaCl-Gradient (60 ml von 0,1 bis 1,0 M und 20 ml von 1,0 bis 1,5 M NaCl) in Startpuffer (Puffer A, s. 2.13.1.1) auf die Säule gegeben. Ansonsten erfolgte die Durchführung der Chromatographie wie bei der HupN-Aufreinigung. Die Fraktionen wurden in einer Tricin-SDS-PAGE analysiert und HupB wurde in den Fraktionen 18 – 25 (entspricht 0,51 – 0,76 M NaCl) gefunden. Aufgrund der noch vorhandenen Kontaminationen durch andere Proteine wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt, eine SP-Sepharose-Chromatographie, durchgeführt. Hierfür wurden die HupB-enthaltenden Fraktionen vereinigt und gegen Startpuffer (Puffer A) dialysiert. Die

Proteinlösung (15 ml) wurde dann auf eine mit Startpuffer äquilibrierte SP-Sepharose-Säule (3 ml Bettvolumen) bei 1 ml/min Fließgeschwindigkeit gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 1 Vol. Startpuffer gewaschen und die Elution erfolgte durch einen 60 ml NaCl-Gradienten (40 ml 0,1 – 0,75 M und 20 ml 0,75 – 1,0 M NaCl). Es wurden Fraktionen von 1,5 ml aufgefangen, die anschließend durch Tricin-SDS-PAGE analysiert wurden. Die Fraktionen 14 und 15 (entsprechend 0,3 M NaCl) enthielten HupB, das eine Reinheit von über 95 % aufwies. Beide Fraktionen, die insgesamt ca. 9 mg Protein enthielten, wurden vereinigt und gegen Startpuffer dialysiert. Nach Hinzufügen von einem gleichen Vol. 87 % (v/v) Glycerin wurde das Protein bei –20 °C eingefroren. Die Analysen der verschiedenen Schritte der HupB-Aufreinigung sind in Abb. 3.18 dargestellt.

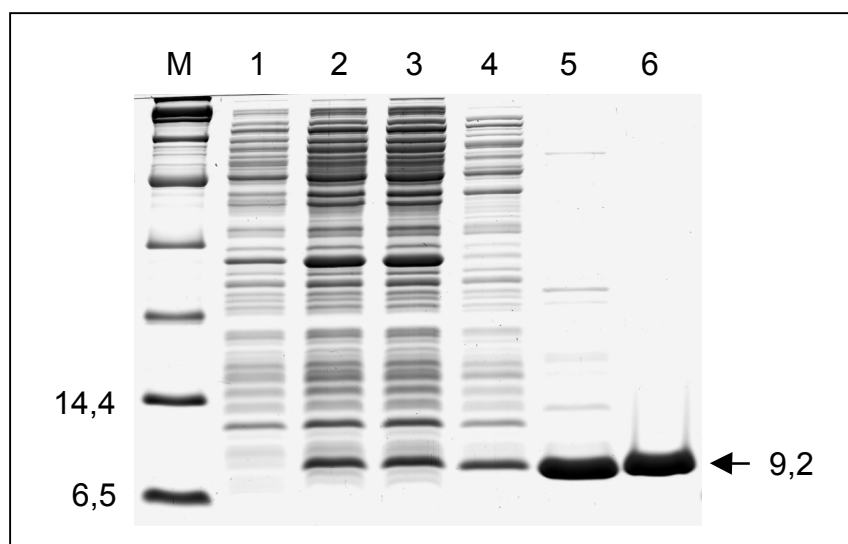


Abb. 3.18: HupB-Aufreinigung. Dokumentation der verschiedenen Reinigungsschritte auf einem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel. Spur M: Proteinstandard (links die Größe der zwei kleinsten Proteine in kDa), Spur 1: nicht-induzierte, ganze Zellen von *P. putida* KT2442 $\Delta hupN$ (pFBT18), Spur 2: induzierte ganze Zellen, Spur 3: klarer Extrakt von induzierten Zellen, Spur 4: Proteinlösung nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung, Spur 5: vereinigte, HupB-enhaltende Fraktionen nach der Heparin-Chromatographie, Spur 6: HupB (Fraktion 14 und 15) nach der SP-Sepharose-Chromatographie. Rechts unten ist die nach der Aminosäuresequenz berechnete Größe von HupB in kDa dargestellt.

3.2.3 Cross-Linking von HupB und HupN

Zur vollen Funktionsfähigkeit, d. h. zum Binden an bzw. zum Knicken der DNA, müssen HU-Proteine Dimere bilden (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987). In *E. coli* existieren zwei HU-

Gene, *hupA* und *hupB*, deren Produkte in Abhängigkeit von der Wachstumsphase hauptsächlich als α_2 -Homodimere bzw. $\alpha\beta$ -Heterodimere vorliegen (Claret & Rouvière-Yaniv, 1997). Darüber hinaus wurde für HU aus *E. coli* gezeigt, daß mehrere HU-Moleküle oligomerisieren können, insbesondere, wenn sie an DNA gebunden sind (Rouvière-Yaniv & Kjeldgaard, 1979; Paci *et al.*, 1984).

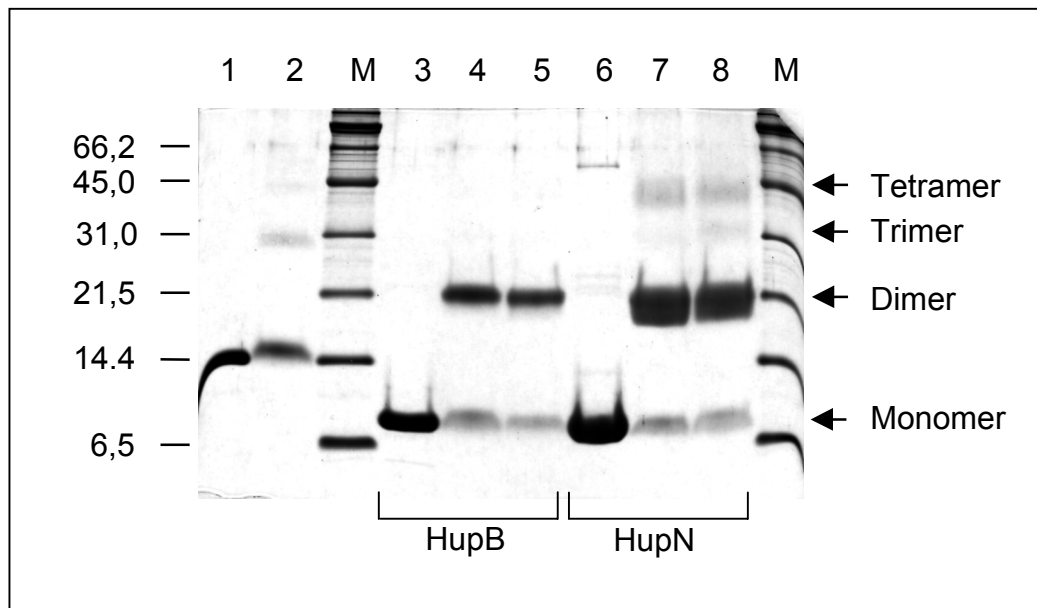


Abb. 3.19: Cross-Linking von HupB und HupN zu sehen auf einem Tricin-SDS-Polyacrylamidgel. Links sind die Größen (in kDa) einiger Standardproteine des Markers (Spuren M) dargestellt. Rechts sind die Positionen der Mono-, Di-, Tri- und Tetramere von HupN durch Pfeile angedeutet. Spur 1: Lysozym (Kontrolle), Spur 2: Lysozym behandelt mit Cross-Linker (Kontrolle), Spur 3: HupB, Spur 4: HupB behandelt mit Cross-Linker, Spur 5: HupB + Plasmid-DNA behandelt mit Cross-Linker, Spur 6: HupN, Spur 7: HupN behandelt mit Cross-Linker, Spur 8: HupN + Plasmid-DNA behandelt mit Cross-Linker.

Um zu untersuchen, ob jeweils HupB und HupN Dimere bilden können und ob sie in Anwesenheit von zirkulärer, überspiralisierter DNA oligomerisieren, wurden sie mit einem Lysin-spezifischen Cross-Linker (Disuccinimidyl suberate) behandelt (s. 2.14.1). Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, bildete HupB nach dem Cross-Linking Dimere (Spur 4) im Vergleich zu unbehandeltem HupB (Spur 3). Ein kleiner Teil von HupB hatte sich nach 15 min Reaktionszeit noch nicht kovalent zum Dimer verbunden (Spur 4). Bei HupB war keine weitere Oligomerisierung zu beobachten, auch nicht in Anwesenheit von 200 nM zirkulärer, überspiralisierter Plasmid-DNA (Spur 5). HupN lag nach dem Cross-Linking ebenfalls

hauptsächlich als Dimer vor, das im Gel allerdings eine Doppelbande bzw. einen Schmier bildet, so daß sich hier die Dimer-Bande nicht ganz eindeutig lokalisieren läßt (Spur 7). Auch bei HupN war ein Teil des Proteins noch nicht dimerisiert. Eine weitere Oligomerisierung zu Tri- und Tetrameren war bei HupN schwach, aber deutlich zu erkennen, wobei offenbar Tetramere in stärkerem Maße gebildet werden als Trimere (Spur 7). Eine Verstärkung der Oligomerisierung war in Anwesenheit von DNA kaum oder nur sehr schwach zu erkennen (Spur 8). Als Kontrolle wurde Lysozym ebenfalls mit dem Cross-Linker behandelt. Lysozym liegt normalerweise als Monomer vor, es ließ sich aber nach dem Cross-Linking eine schwache Dimerisierung bzw. Oligomerisierung erkennen (Spur 2), die sich möglicherweise durch eine zu hohe Lysozymkonzentration im Reaktionsansatz erklären läßt.

3.2.4 Die Aktivität von HupB und HupN in *in vitro*-Rekombinationstests

Es wurde bereits gezeigt, daß natives HU-Protein aus *P. putida* KT2442 die β -Protein-abhängige Rekombination stimuliert (s. 3.1.6). Hierbei katalysiert das β -Protein eine Rekombination an sog. *six sites*, die sich auf einem Test-Plasmid (pCB8) befinden, wobei die Anwesenheit von HU für die Rekombination erforderlich ist. Es stellte sich daher die Frage, ob und in welchem Maße sich die Aktivitäten von HupB und HupN bei der β -Rekombination unterscheiden. Mit den bereits veröffentlichten Daten für HU aus *E. coli* (Alonso *et al.*, 1995) können dann die Aktivitäten der beiden Proteine verglichen werden.

Die Durchführung der *in vitro*-Rekombinationstests erfolgte wie unter 2.14.2 beschrieben. In den Ansätzen wurden jeweils Konzentrationen von 50, 75, 100, 150 und 200 nM HupB bzw. HupN eingesetzt. Zur Analyse wurden die Ansätze in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3.20). Es zeigte sich, daß mit HupB ab einer Konzentration von 150 nM annähernd 100 % Rekombination erreicht wurde. Im Falle von HupN konnten bereits bei 75 nM Rekombinationsereignisse beobachtet werden, bei 100 nM hatten bereits 80 % des DNA-Substrats Rekombinationsprozesse durchlaufen. Bei 150 nM HupN wurden wie bei 150 nM HupB ebenfalls Rekombinationsraten von 100 % erreicht.

Bei Alonso *et al.* (1995) wurde in β -Rekombinationstests heterodimeres HU (rekonstituiert aus HU α und HU β) sowie homodimeres HU α bzw. HU β aus *E. coli* in den Konzentrationen 50, 100 und 200 nM untersucht. Die Homodimere unterschieden sich hierbei deutlich, da Rekombination durch HU β bereits bei 50 nM und durch HU α erst ab 200 nM stimuliert wurde. In diesen Versuchen zeigte heterodimeres HU, das die Rekombination bei 50 nM zu 50 % und bei 200 nM zu 100 % Rekombination stimulierte, mittlere Rekombinationsaktivität.

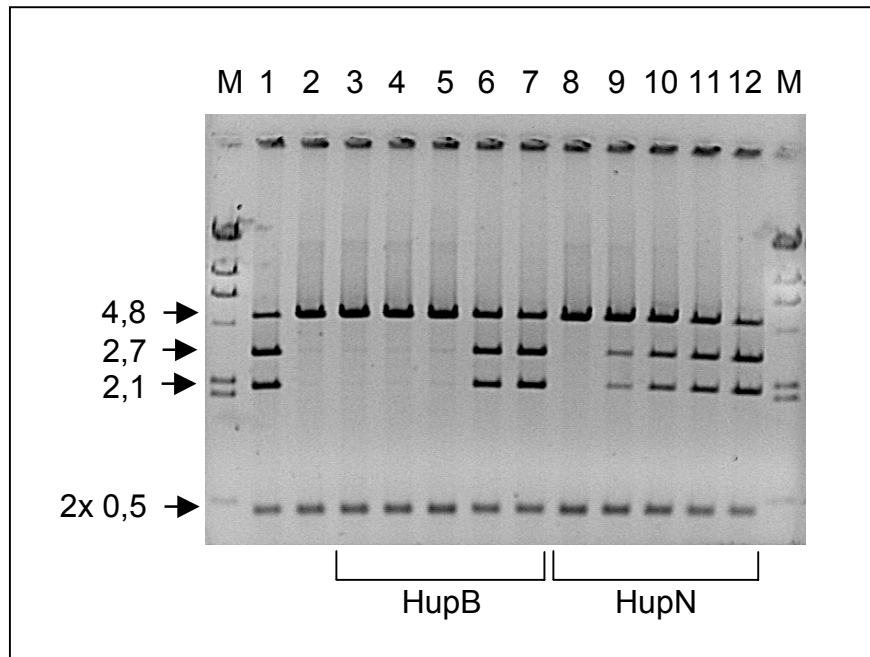


Abb. 3.20: Stimulation der β -Protein-abhängigen Rekombination bei verschiedenen Konzentrationen von HupB und HupN. Die Reaktionen wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel untersucht. Links sind die Größen der DNA-Fragmente, die nach der Reaktion durch Restriktionsverdau des Substrat-Plasmids pCB8 erhalten wurden, in kb dargestellt. Spur M: Molekulargewichtsmarker (λ -DNA geschnitten mit *Hind*III), Spur 1: 200 nM HBSu (Positivkontrolle), Spur 2: kein HU (Negativkontrolle), Spur 3: 50 nM HupB, Spur 4: 75 nM HupB, Spur 5: 100 nM HupB, Spur 6: 150 nM HupB, Spur 7: 200 nM HupB, Spur 8: 50 nM HupN, Spur 9: 75 nM HupN, Spur 10: 100 nM HupN, Spur 11: 150 nM HupN und Spur 12: 200 nM HupN.

3.3 Überexpression, Aufreinigung und Charakterisierung von IHF aus *P. putida* KT2442

IHF (integration host factor) ist an der Bildung von Nucleo-Protein-Komplexen des bakteriellen Nucleoids beteiligt und spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987). IHF ist ein Heterodimer, hat strukturelle Ähnlichkeit zu HU aber bindet DNA nur an spezifischen Sequenzen. Die Gene, die für die beiden Untereinheiten IhfA und IhfB codieren sind in allen bisher untersuchten Gram-negativen Bakterien vorhanden und konserviert (Haluzi *et al.*, 1991). Die Rolle von IHF bei der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 ist verschieden. Die Transkription von Pu aus wird durch IHF

stimuliert, indem es einerseits durch Bindung an eine spezifische DNA-Region die an der Aktivierung von Pu beteiligten Proteine zusammenbringt und andererseits die Affinität der RNA-Polymerase zum Promotor erhöht (Bertoni *et al.*, 1998). Das Gegenteil ist offenbar bei dem Ps1-Promotor der Fall, da hier die Anwesenheit von IHF die Transkriptionsaktivität vermindert (Marqués *et al.*, 1998).

3.3.1 Konstruktion eines IHF-Expressionsplasmids

Zur späteren Aufreinigung von IHF sollte ein Produktionsstamm hergestellt werden, der IHF aus *P. putida* KT2442 überexprimiert. Die Gene für die beiden IHF-Untereinheiten, *ihfA* und *ihfB*, sind bereits sequenziert und charakterisiert (Calb *et al.*, 1996). Damit in der Zelle aktives IHF synthetisiert wird, müssen *ihfA* und *ihfB* gleich stark exprimiert werden, da die Synthese von IhfA- und IhfB-Homodimeren zu unlöslichen Aggregaten bzw. durch Proteasen teilweise abgebauten Proteinen führt (Nash *et al.*, 1987).

Im Laufe dieser Arbeit wurden verschiedene Strategien und Konstrukte zur Überexpression der IHF-Gene verwendet, die hier aber nur kurz dargestellt werden. Anschließend wird die Konstruktion des endgültigen Expressionsplasmids näher beschrieben. Die einzelnen Konstrukte sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Konstrukte zur Expression von *ihfA* und *ihfB*

Nr.	Konstrukt	Beschreibung	Höhe der Expression (Intensität der Bande in SDS-PAGE)
1	pFBT4	<i>ihfAB</i> als <i>NcoI</i> - <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment in pTrc99A	gering
2	pFBT5	<i>ihfB</i> als <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment in pT7-7	mittel (unlösliches Protein)
3	pFBT6	<i>ihfBA</i> als <i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment in pT7-7	mittel (unlösliches Protein)
4	pFBT7	<i>ihfA</i> als <i>Nco</i> I- <i>Bam</i> HI-Fragment in pET-3d	gering
5	pFBT13	2 Kopien des P _{T7} - <i>ihfA</i> -Fragments aus pFBT7	mittel
6	pFBT15	pFBT13 mit dem P _{T7} - <i>ihfB</i> -Fragment aus pFBT5	hoch (lösliches Protein)

Zunächst wurden *ihfA* und *ihfB* mit jeweils einer starken SD-Sequenz als *Nco*I-*Bam*HI-*Hind*III-Fragment in pTrc99A (Tab. 2.3) kloniert. Hierbei kontrollierte der mit IPTG induzierbare P_{Trc}-Promotor die bicistronische *ihfAB*-Kassette. Das resultierende Plasmid

pFBT4 wurde in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transferiert, da diese keine Lon- und OmpT-Proteasen besitzen, welche für die Degradation einiger überexprimierter Proteine verantwortlich sind. Die Expression der *ihfAB*-Kassette wurde dann durch SDS-PAGE analysiert, wobei eine sehr geringe Proteinsynthese im Bereich von ca. 11 kDa zu beobachten war. Da der $P_{T_{rc}}$ -Promotor relativ stark ist, stellte sich die Frage nach dem Grund für die geringe IHF-Synthese.

Um im nächsten Schritt die Expression der einzelnen *ihf*-Gene zu untersuchen, wurde *ihfB* als *NdeI*-*BamHI*-Fragment in das Expressionsplasmid pT7-7 (Tab. 2.3) kloniert, welches den sehr starken P_{T7} -Promotor enthält. Das resultierende Plasmid (pFBT5) wurde in BL21 (DE3) transferiert und nach Induktion mit IPTG wurde die Expression von *ihfB* mittels SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich eine intensive Bande bei ca. 11 kDa, allerdings nur in der unlöslichen Fraktion (d. h. im Pellet nach der Zentrifugation des Rohextrakts). Das gleiche Ergebnis wurde mit dem Konstrukt (pFBT6) erhalten, in dem das *ihfA*-Gen stromabwärts von *ihfB* in pFBT5 kloniert wurde. Unter der Annahme, daß eine gleich hohe Expression von *ihfA* und *ihfB* zu löslichem IHF-Protein führt, und da mit pFBT6 hauptsächlich unlösliches Protein exprimiert wurde, deutete dies auf eine starke *ihfB*-Expression und eine geringe *ihfA*-Expression hin. Offenbar wird bei einer schwachen *ihfA*-Expression hauptsächlich IhfB synthetisiert, das dann, wie in *E. coli* (Nash *et al.*, 1987), Homodimere bildet und als unlösliches Protein ausfällt.

Im nächsten Schritt wurde durch die Klonierung von *ihfA* in den P_{T7} -Expressionsvektor pET-3d (resultierendes Konstrukt pFBT7, transferiert in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen) bestätigt, daß das *ihfA*-Gen auch bei Verwendung eines starken Promotors nur schwach exprimiert wird. Die Unterschiede in der Codon Usage zwischen *E. coli* und *P. putida* konnten als Grund für die geringe Expression ausgeschlossen werden, da in dem *P. putida* *ihfA*-Gen keine besonders seltenen Codons verwendet werden. Um zu überprüfen, ob sich die Synthese von IhfA durch eine doppelte *ihfA*-Kopienzahl erhöhen läßt, wurde das P_{T7} -*ihfA*-Fragment aus pFBT7 nochmals in pFBT7 kloniert. Das resultierende Plasmid pFBT13 enthielt somit zwei *ihfA*-Kopien, die jeweils von einem P_{T7} -Promotor transkribiert werden. Induzierte BL21 (DE3) (pFBT13)-Zellen zeigten auf einem SDS-PA-Gel nun wie erwartet eine erhöhte IhfA-Synthese, die in der Proteinmenge mit der IhfB-Synthese des pFBT5-Konstrukts zu vergleichen war. Für die Konstruktion eines IHF-Expressionsplasmids wurde schließlich das P_{T7} -*ihfB*-Fragment aus pFBT5 in pFBT13 kloniert. Aufgrund der nun etwa gleich starken Synthese der beiden *ihf*-Genprodukte IhfA und IhfB produzierte das resultierende Konstrukt pFBT15 in induzierten BL21 (DE3)-Zellen große Mengen an löslichem *P. putida*-IHF. Nach partieller Aufreinigung von IHF aus BL21 (DE3) (pFBT15) nach dem unter 2.13.1.1 beschriebenen Protokoll sowie nach N-terminaler Sequenzierung der auf eine Membran geblotteten IHF-Proteinbande (s. 2.13.6) wurde die Zusammensetzung von IHF aus gleichen Mengen von IhfA und IhfB bestätigt.

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Strategien zur Überexpression von *P. putida*-IHF führten schrittweise schließlich zur Konstruktion von pFBT15. Dieses Plasmid wurde im weiteren Verlauf zur Überexpression in einem Produktionsstamm und anschließenden Aufreinigung von IHF verwendet. Im folgenden werden die einzelnen Klonierungsschritte, die zur Konstruktion von pFBT15 führten, detailliert beschrieben.

Das *ihfA*-Gen wurde mittels PCR als ein ca. 320 bp großes *NcoI*-*BamHI*-Fragment amplifiziert, wobei die Primer PLHIMA und PRHIMA (s. 2.10) bei einer T_a von 50 °C sowie genomische DNA von *P. putida* KT2442 als Template verwendet wurden. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert und anschließend im resultierenden Plasmid pFBT1 zur Kontrolle sequenziert. pFBT1 wurde dann mit *NcoI* und *BamHI* verdaut und das entstandene *ihfA*-Fragment wurde mit dem ebenfalls mit *NcoI*- und *BamHI*-verdauten Expressionsvektor pET-3d ligiert. Das resultierende Plasmid pFBT7 wurde weiterhin mit *SphI* geschnitten und die zurückgesetzten Enden wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, um Blunt Ends zu erhalten. Im nächsten Schritt wurde mit *HindIII* verdaut und somit enthielt das erhaltene, ca. 1,1 kb große Fragment den P_{T7} -Promotor, die SD-Sequenz aus dem Vektor mit dem stromabwärts liegenden *ihfA*-Gen sowie einen T7-Terminator. Dieses Fragment wurde dann durch eine Blunt End-Sticky End-Ligation mit dem mit *EcoRV*- und *HindIII*-geschnittenen Plasmid pFBT7 verbunden. Auf diese Weise erhielt das resultierende Plasmid pFBT13 zwei Kopien des *ihfA*-Gens in gleicher Orientierung, welche jeweils von einem P_{T7} -Promotor kontrolliert werden.

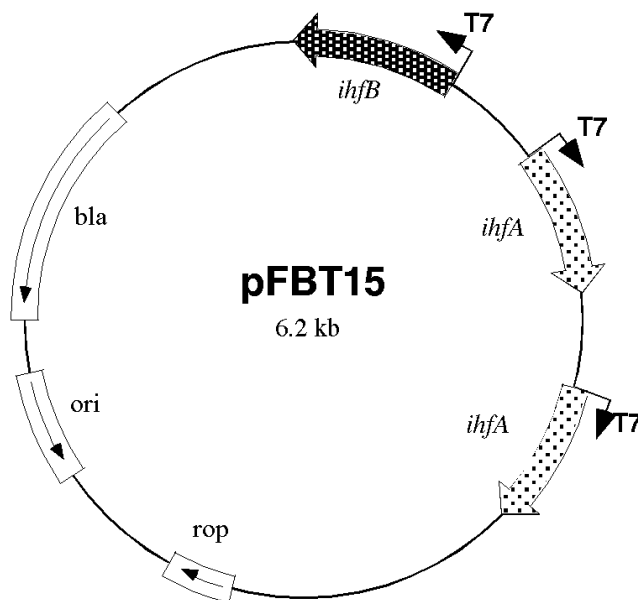


Abb. 3.21: Plasmid-Karte von pFBT15. Die zwei *ihfA*-Gene und *ihfB* werden jeweils von einem P_{T7} -Promotor transkribiert. Weitere Plasmid-Elemente: Ampicillin-Resistenz (*bla*), Replikationsursprung (*ori*) und das Gen für einen Proteinrepressor zur Kontrolle der Kopienzahl (*rop*).

Zur PCR-Amplifikation des *ihfB*-Gens wurden die Primer PLHIP3 und PRHIP2 (s. 2.10) bei einer T_a von 50 °C und das Plasmid pFBT4 als DNA-Template verwendet. Das ca. 320 bp große PCR-Fragment besitzt flankierende Restriktionsschnittstellen (*Nde*I am 5'- und *Bam*HI am 3'-Ende), und es wurde direkt mit den Enzymen verdaut und anschließend in den mit den entsprechenden Enzymen verdauten Expressionsvektor pT7-7 kloniert. Das resultierende Plasmid pFBT5 wurde dann mit *Bgl*II geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und schließlich mit *Sal*I verdaut. Auf diese Weise wurde ein ca. 650 bp großes *ihfB*-Fragment erzeugt, das stromaufwärts von *ihfB* die SD-Sequenz und den P_{T7} -Promotor aus pT7-7 umfaßte. Um letztlich das IHF-Expressionsplasmid zu erzeugen wurde das *ihfB*-Fragment durch eine Blunt End-Sticky End-Ligation mit pFBT13 verbunden, welches zuvor mit *Sph*I geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und dann mit *Sal*I verdaut wurde. Die Orientierung von *ihfB* im entstandenen pFBT15-Plasmid ist der Richtung der beiden *ihfA*-Kopien entgegengesetzt, um die Expression von *ihfA* nicht zu stören. Eine schematische Darstellung von pFBT15 ist in Abb. 3.21 wiedergegeben.

3.3.2 Aufreinigung von IHF aus *P. putida* KT2442

Zur Überexpression der *P. putida*-Gene für das IHF-Protein wurde das Plasmid pFBT15 konstruiert, welches in einem geeigneten Wirtstamm die Synthese gleicher Mengen an IHF-Untereinheiten bewirkt und so die Bildung von löslichem IHF sicherstellt. Die IHF-Gene werden in pFBT15 von P_{T7} -Promotoren kontrolliert und benötigen daher die T7-RNA-Polymerase zur Transkription. Der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) besitzt zwar das Gen für die T7-Polymerase, die Synthese von *P. putida*-IHF führt aber zu einer Verunreinigung des Proteins mit wirtseigenem (*E. coli*-) IHF. Um dieses Problem zu umgehen, wurde pFBT15 in *E. coli* BL21 (DE3) JW186 transferiert. In dieser Variante des Stammes BL21 (DE3) sind die wirtseigenen IHF-Gene inaktiviert worden, daher wurde dieser Stamm bereits zur Expression von *Pseudomonas aeruginosa*-IHF verwendet (Delic-Attree *et al.*, 1996).

Das Protokoll der Aufreinigung von IHF ist unter 2.13.1.1 beschrieben. Zunächst wurden 5 l LB-Medium mit Antibiotika (Amp^{100} , Cm^{30} und Tet^5) mit 1/100 Vol. einer ÜN-Kultur von *E. coli* BL21 (DE3) JW186 (pFBT15) beimpft und für ca. 12 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Aufgrund der relativ niedrigen Teilungsrate des Stammes lag die OD_{600} nach ca. 12 h bei 0,8. Zur Induktion wurde dann 1 mM (Endkonzentration) IPTG hinzugefügt und die Kultur wurde für 4 h unter gleichen Bedingungen weiterinkubiert. Nach dieser Zeit betrug die OD_{600} ca. 1,0 und die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und bei -80 °C eingefroren. Die 16,8 g Zellen (Naßgewicht) wurden dann wie im Protokoll beschrieben aufgeschlossen und der Extrakt wurde einer 2stufigen Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Nach der anschließenden Dialyse gegen 5 l Puffer A bildete sich ÜN ein heller Niederschlag im Dialyseschlauch. Dieses Präzipitat bestand hauptsächlich aus IHF und entstand offenbar aufgrund der relativ hohen IHF-Konzentration in der Lösung. Die Konzentration von löslichem IHF blieb trotz des Niederschlags weiterhin hoch. Zur Entfernung des

Niederschlags wurde die Proteinlösung für 10 min abzentrifugiert (Sorvall SS-34-Rotor, 16000 Upm bei 4 °C).

Im nächsten Schritt wurde eine Heparin-Sepharose-Chromatographie wie unter 2.13.2.1 beschrieben durchgeführt. Eine 5 ml-Heparin-Sepharose-Säule wurde gepackt und mit Puffer A äquiliбриert. Die ca. 40 ml IHF-Proteinlösung wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule gegeben, die danach solange mit Puffer A gewaschen wurde bis die OD₂₈₀ einen konstanten Wert erreichte. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte durch einen Salzgradienten von 0,1 bis 1,7 M NaCl in Puffer A bei einer Flußrate von 1 ml/min. Der Gradient hatte ein Gesamtvolumen von 70 ml und teilte sich auf in 20 ml von 0,1 – 0,6 M NaCl, 10 ml bei konstant 0,6 M NaCl und 40 ml von 0,6 – 1,7 M NaCl. Die Größe der Fraktionen betrug 5 ml von 0,1 bis 0,6 M sowie 2 ml von 0,6 bis 1,7 M NaCl. Nach Analyse der Fraktionen in einer 15 %igen Tricin-SDS-PAGE wurde festgestellt, daß sich das IHF-Protein in den Fraktionen 17 bis 21 in hoher Konzentration und Reinheit befindet. Die Salzkonzentration, bei der IHF eluiert, liegt somit zwischen 1,0 und 1,3 M NaCl. Einzelne Schritte der Aufreinigung sind in Abb. 3.22 dokumentiert. Die Fraktionen wurden vereinigt, gegen Puffer A dialysiert und mit 44 % Glycerin (v/v) bei -20 °C eingefroren.

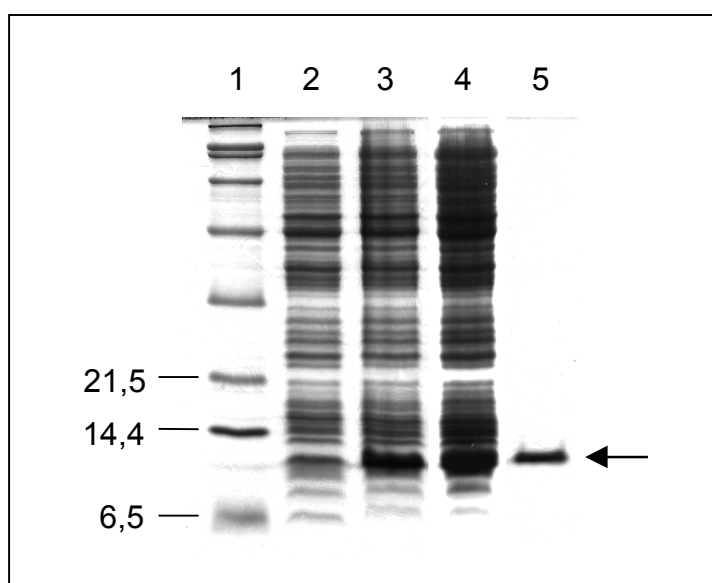


Abb. 3.22: Dokumentation der IHF-Aufreinigung durch ein 15 %iges Tricin-SDS-Gel. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (links die Größe einiger Standardproteine in kDa), Spur 2: nicht induzierte, ganze Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) JW186 (pFBT15), Spur 3: induzierte, ganze Zellen, Spur 4: klarer Zellextrakt nach dem Aufschluß, Spur 5: vereinigte IHF-haltige Fraktionen nach der Heparin-Sepharose-Chromatographie (der Pfeil rechts deutet auf die IHF-Bande mit einer Größe von ca. 11 kDa).

Zur Kontrolle wurde eine N-terminale Sequenzierung (s. 2.13.6) des IHF-Proteins durchgeführt, die ergab, daß in der Präparation die Konzentration von IhfA ungefähr halb so groß war wie die von IhfB. Damit zeigte sich, daß die Expression von *ihfA* trotz der doppelten Kopienzahl in pFBT15 deutlich geringer war als die *ihfB*-Expression. Da wahrscheinlich in *P. putida* wie in *E. coli* (Nash *et al.*, 1987) IHF ein $\alpha\beta$ -Heterodimer ist bzw. die Bildung von Heterodimeren gegenüber der Bildung von Homodimeren begünstigt ist, besteht demnach die *P. putida*-IHF-Präparation aus ca. 70 % $\alpha\beta$ -Heterodimer und ca. 30 % β_2 -Homodimer.

3.3.3 Aktivität von IHF in *in vitro*-Rekombinationstests

Um die Aktivität des aufgereinigten *P. putida*-IHF-Proteins zu bestimmen und mit der des *E. coli*-IHF-Proteins zu vergleichen, wurden β -Protein-abhängige *in vitro*-Rekombinationstests durchgeführt (s. 2.14.2). In den Tests wurden IHF-Konzentrationen von 45 nM bis 1600 nM eingesetzt (bezogen auf das $\alpha\beta$ -Heterodimer). Wie in Abb. 3.23 zu sehen ist, fand bei Konzentrationen von 45, 90 und 180 nM IHF keine Rekombination statt, da hier keine sichtbaren Reaktionsprodukte bei 2,7 bzw. 2,1 kb zu sehen waren. Ab einer IHF-Konzentration von 400 nM zeigten sich die Reaktionsprodukte, deren Intensität bei höheren Konzentrationen nicht mehr zunahm. D. h., daß zwischen 180 nM und 400 nM IHF im Reaktionsansatz vollständige Rekombination erreicht wurde.

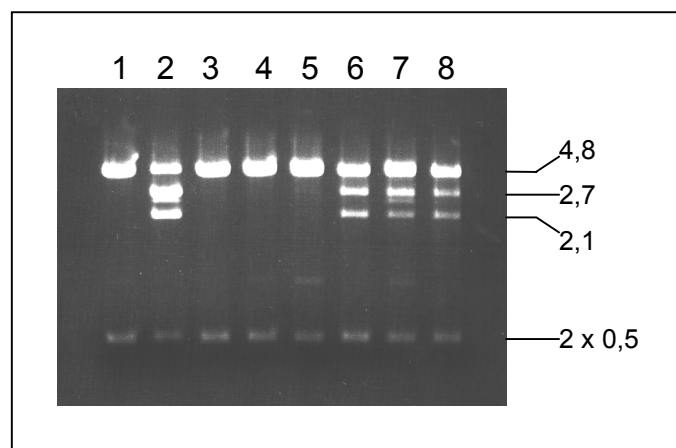


Abb. 3.23: 0,8 %iges Agarosegel mit den Reaktionsprodukten der *in vitro*-Rekombinationstests zur Bestimmung der Aktivität des IHF-Proteins von *P. putida*. Spur 1: Negativkontrolle ohne HBsu oder IHF, Spur 2: Positivkontrolle mit 200 nM HBsu aus *B. subtilis*, Spur 3: 45 nM IHF, Spur 4: 90 nM IHF, Spur 5: 180 nM IHF, Spur 6: 400 nM IHF, Spur 7: 800 nM IHF, Spur 8: 1600 nM IHF. Rechts: die Größen der Fragmente in kb. Einige zusätzliche, schwache Banden stellen unspezifische Produkte des Restriktionsverdaus dar.

In den gleichen Rekombinationstests wurde für IHF aus *E. coli* Rekombination ab einer Konzentration von 360 nM festgestellt (Alonso *et al.*, 1995). Die Intensität der

Reaktionsprodukte war dabei allerdings deutlich geringer (im Vergleich zu dem beim Verdau immer entstehenden 4,8 kb-Fragment) als mit dem *P. putida*-IHF in Abb. 3.23. Damit ist die spezifische Aktivität des *P. putida*-IHF-Proteins mindestens ebenso hoch wie bei Präparationen von IHF aus *E. coli*.

3.3.4 Untersuchung der Bindung von *P. putida*-IHF im Pu-Promotor

Zur Bildung eines transkriptionsaktiven Protein-DNA-Komplexes in Pu wird IHF benötigt. Um zu untersuchen, wie stark das IHF-Protein aus *P. putida* innerhalb des Pu-Promotors bindet, wurden Gel-Retentionsanalysen durchgeführt (Durchführung s. 2.14.3). Das Pu-Promotorfragment war 230 bp groß und enthielt die IHF-Bindestelle (s. Abb. 3.24), die im Bereich von 53 bis 79 bp stromaufwärts von den -12/-24-Promotorelementen liegt, welche typisch für σ^{54} -abhängige Promotoren sind.

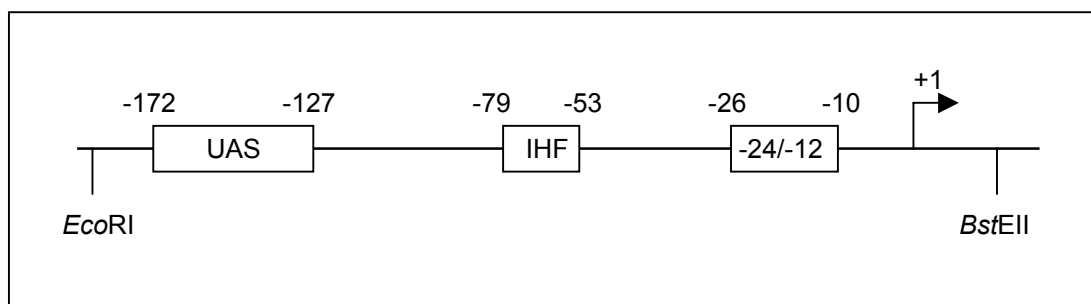


Abb. 3.24: Schematische Darstellung des 230 bp großen Pu-Promotorfragments (nach Bertoni *et al.*, 1998). Eingerahmt sind die Promotor-Consensussequenzen (-24/-12), die IHF-Bindungsstelle (IHF) und die Bindungsstelle des XylR-Aktivatorproteins (UAS). Die Zahlen geben die Nukleotidpositionen der Pu-Promotorelemente relativ zum Transkriptionsstart (+1) an.

Zunächst wurden Gel-Retentionsanalysen mit verschiedenen Konzentrationen des IHF-Proteins aus *P. putida* unter solchen Bedingungen durchgeführt, unter denen das *E. coli*-IHF-Protein optimal an die IHF-Bindungsstelle in Pu bindet. Diese Bedingungen unterschieden sich in den unter 2.14.3 genannten darin, daß ein Reaktionspuffer mit relativ hohem Salzgehalt und niedriger Glycerinkonzentration verwendet wurde (35 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 70 mM K-Acetat, 5 mM Mg-Acetat, 19 mM Ammoniumacetat, 10 mM MgCl₂, 0,7 mM DTT, 3 % (v/v) Glycerin, 20 µg/ml Polyd(IC) und 75 µg/ml BSA). Es wurden dann Konzentrationen des *P. putida*-IHF-Proteins von 8 nM bis 1200 nM eingesetzt und zum Vergleich wurde ein Ansatz mit 50 nM des IHF-Proteins aus *E. coli* parallel verarbeitet. Als Laufpuffer für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der oben genannte Reaktionspuffer ohne MgCl₂, Polyd(IC) und BSA. Das Ergebnis der Gelretentionsanalyse ist in Abb. 3.25 gezeigt. Während mit *P. putida*-IHF auch bei der höchsten Konzentration von 1200 nM nur ein äußerst schwache Retention der Bande (größeres Molekulargewicht des IHF-

DNA-Komplexes im Vergleich zu freier DNA) zu erkennen war, konnte in der Kontrolle mit 50 nM *E. coli*-IHF eine vollständige Retention (IHF bindet die gesamte DNA) beobachtet werden.

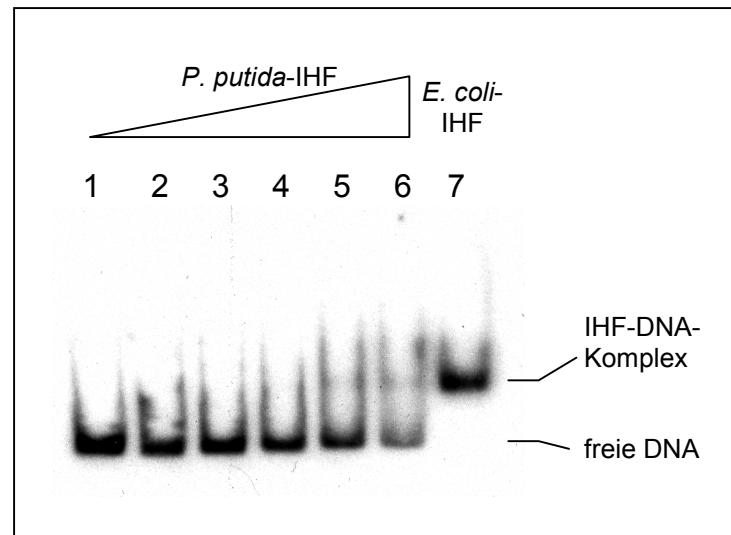


Abb. 3.25: Autoradiogramm eines 5 %igen Polyacrylamidgels zur Analyse der Retention eines radioaktiv markierten Pu-Promotorfragments durch gebundenes IHF. Spur 1: Negativkontrolle ohne IHF, Spur 2: 8 nM *P. putida*-IHF, Spur 3: 40 nM *P. putida*-IHF, Spur 4: 80 nM *P. putida*-IHF, Spur 5: 400 nM *P. putida*-IHF, Spur 6: 1200 nM *P. putida*-IHF und Spur 7: 50 nM *E. coli*-IHF.

Da sich *P. putida*-IHF in *in vitro*-Rekombinationstests als ähnlich aktiv wie *E. coli*-IHF herausgestellt hatte, ist das hiervon abweichende Ergebnis für die beiden IHF-Präparationen im Retentionstest wohl nicht auf eine geringere spezifische Aktivität des *P. putida*-IHF-Proteins gegenüber dem *E. coli*-IHF-Protein zurückzuführen. Allerdings war bekannt, daß die Ionenstärke bzw. Salzkonzentration des Reaktionspuffers einen starken Einfluß auf die Bindung von Histon-ähnlichen Proteinen an DNA hat (Pinson *et al.*, 1999). Deshalb wurde in einem weiteren Gel-Retentionstest ein Reaktions- und Laufpuffer mit geringerer Salzkonzentration und höherer Glycerinkonzentration (10 % (v/v)) verwendet. Die Durchführung dieses zweiten Retentionstests erfolgte wie unter 2.14.3 beschrieben mit den dort aufgeführten Puffern. *P. putida*-IHF wurde in den Konzentrationen 400 nM, 800 nM und 1600 nM getestet und das Ergebnis ist als Autoradiogramm in Abb. 3.26 zu sehen. Hierbei zeigte sich bei 400 nM IHF bereits eine vollständige Retention. Bei höheren Konzentrationen bildete sich sogar ein kompakter Protein-DNA-Komplex, der nicht mehr in das Gel hinein wanderte und deshalb in den Geltaschen verblieb.

Diese Ergebnisse zeigen klar, daß *P. putida*-IHF im Pu-Promotor bindet. Offenbar besitzt *P. putida*-IHF für die Bindungsstelle allerdings eine geringere Affinität bzw. eine höhere Dissoziationskonstante als *E. coli*-IHF.

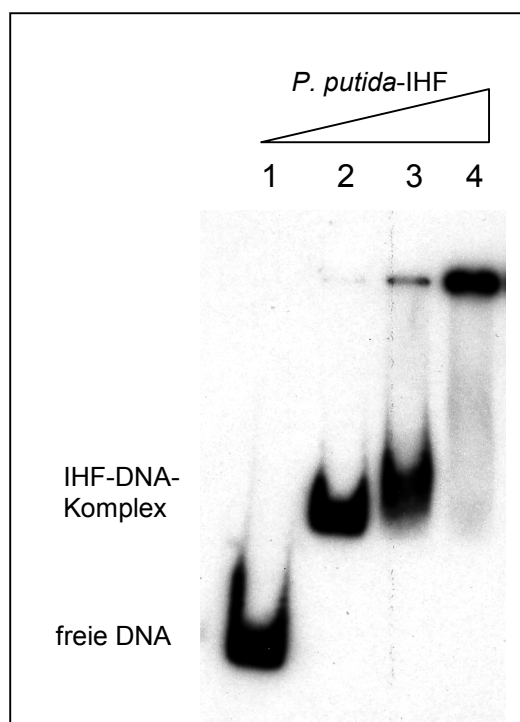


Abb. 3.26: Gel-Retentionsanalyse (Autoradiogramm) mit *P. putida*-IHF und einem Pu-Promotorfragment unter weniger stringenten Bedingungen (geringe Salzkonzentration, hohe Glycerinkonzentration). Spur 1: Negativkontrolle ohne IHF, Spur 2: 400 nM IHF, Spur 3: 800 nM IHF und Spur 4: 1600 nM IHF.

3.4 Überexpression und Aufreinigung von σ^{54} aus *P. putida*

Sigma-Faktoren sind an der Erkennung und Bindung des RNA-Polymerase-Holoenzym an spezifische Promotorsequenzen beteiligt und stellen vorübergehend eine Untereinheit der RNA-Polymerase dar. Während die meisten bakteriellen Gene zur Expression den Standard-Sigma-70-Faktor benötigen, ist die Expression bestimmter Gengruppen von spezifischen Sigma-Faktoren abhängig. Sigma-54-Faktoren wurden u. a. auch in verschiedenen Vertretern der Purpurbakterien gefunden. σ^{54} reguliert beispielsweise die Expression des Gens für die Glutaminsynthetase in *E. coli* und die der Gene für die Stickstofffixierung in *Klebsiella pneumoniae*, *Rhodobacter capsulatus* und anderen Bakterien (Kustu *et al.*, 1989). Die Promotoren Pu und Ps1 auf dem TOL-Plasmid in *P. putida* KT2442, die die Expression bestimmter Gene für den Toluol- bzw. Xylolabbau kontrollieren, sind ebenfalls von σ^{54} abhängig.

Bereits isoliert und sequenziert wurde das Gen (nach unterschiedlicher Nomenklatur

rpoN oder *ntrA*) für σ^{54} aus *P. putida* KT2442 (Köhler *et al.*, 1989) und *P. putida* TN2100 (Inouye *et al.*, 1989). Beide Gene unterscheiden sich nur unwesentlich durch 3 Basenaustausche, die zu 2 Aminosäureaustausche bei einer Gesamtlänge von 498 AS führen. Eine Besonderheit von σ^{54} ist, daß das Molekulargewicht des Proteins ermittelt durch eine SDS-PAGE viel größer erscheint (78 kDa, Köhler *et al.*, 1989) als das nach der abgeleiteten Aminosäuresequenz errechnete Gewicht (56,2 kDa).

Für die Konstruktion eines Plasmids zur Überexpression von σ^{54} aus *P. putida* wurde das ca. 1,7 kb große *NcoI-HindIII*-Fragment aus pBKT7-1+*ntrA*, welches das von Inouye *et al.* (1989) sequenzierte *rpoN*-Gen enthielt, in die entsprechenden Schnittstellen von pTrc99A (Tab. 2.3) kloniert. Die Expression von *rpoN* war damit im resultierenden Plasmid pFBT19 durch IPTG induzierbar und wurde von dem relativ starken P_{trc} -Promotor kontrolliert. pFBT19 wurde in den *E. coli*-Stamm TH1 transferiert, der ein durch Deletion inaktiviertes *rpoN*-Gen besitzt. Auf diese Weise wurde die Verunreinigung des *P. putida*- σ^{54} -Proteins durch das wirtseigene *E. coli*- σ^{54} vermieden.

Zur Aufreinigung von σ^{54} wurden 3 l einer Kultur von *E. coli* TH1 (pFBT19) wie unter 2.13.1.2 beschrieben angezogen und aufgearbeitet. Wie in Abb. 3.27 zu sehen ist, befand sich das gesamte σ^{54} -Protein in hoher Konzentration als „inclusion bodies“ in der unlöslichen Fraktion. Nach dem Waschen der „inclusion bodies“ und dem De- und Renaturieren bestand die Proteinlösung hauptsächlich aus σ^{54} .

Im nächsten Schritt wurde eine Heparin-Sepharose-Chromatographie durchgeführt. Diese Affinitäts-Chromatographie selektiert korrekt gefaltetes σ^{54} und damit aktives σ^{54} -Protein, da es nur in dieser Form an Heparin (ein DNA-Analogon) binden kann (Cannon *et al.*, 1996). Es wurde eine 5 ml-Säule mit Heparin-Sepharose CL-6B gepackt und mit Startpuffer (TGEMN-Puffer (s. 2.13.1.2) mit 100 mM NaCl und 10 mM $MgCl_2$) äquilibriert. Die σ^{54} -haltige Proteinlösung (ca. 35 ml) wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule gegeben und anschließend wurde die Säule so lange mit Startpuffer gespült, bis kein Protein mehr eluierte. Dann wurde ein 50 ml-Gradient von 0,1 M bis 1,0 M NaCl in TGEMN-Puffer mit 10 mM $MgCl_2$ und einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule gegeben. Es wurden Fraktionen der Größe 2 ml aufgefangen, die anschließend in einer 10 %igen SDS-PAGE analysiert wurden. Das σ^{54} -Protein konnte in den Fraktionen 10-21 wiedergefunden werden und war zu ca. 80 % rein mit einer Verunreinigung durch ein ca. 40 kDa-Protein (Abb. 3.27). σ^{54} eluierte hauptsächlich zwischen 0,4 M und 0,6 M NaCl. Die Fraktionen 10-21 wurden vereinigt und gegen 2 l TGEMN-Puffer mit 100 mM NaCl ÜN dialysiert.

Als nächstes wurden eine SP-Sepharose- sowie eine Q-Sepharose-Chromatographie durchgeführt. Beide Säulenmaterialien sind Ionenaustauscher und sowohl die Durchführung (s. 2.13.2.2) als auch die Bedingungen waren für beide Chromatographien identisch. Es wurden jeweils 5,5 ml-Säulen gepackt, die dann mit TGEMN-Puffer mit 100 mM NaCl (Startpuffer) äquilibriert wurden. Nachdem die Proteinlösung auf die Säulen gegeben wurde,

wurden die Säulen mit Startpuffer gewaschen, bis die OD_{280} gegen 0 ging. Dann wurde ein 60 ml-Gradient von 0,1 M bis 1,0 M NaCl in TGEMN-Puffer auf die Säulen gegeben, wobei 2 ml-Fractionen aufgefangen wurden. Die SP-Sepharose-Säule (Kationenaustauscher) trennte die Haupt-Verunreinigung bei 40 kDa von σ^{54} , da das 40 kDa-Protein auf der Säule verblieb, während σ^{54} im Startpuffer nicht von der Säule gebunden wurde. Geringere Verunreinigungen wurden dann schließlich durch die Q-Sepharose-Säule (Anionenaustauscher) entfernt, wobei σ^{54} bei einer NaCl-Konzentration von 0,4 M bis 0,5 M eluierte. Die einzelnen Schritte der σ^{54} -Aufreinigung sind auf dem Proteingel in Abb. 3.27 zu sehen.

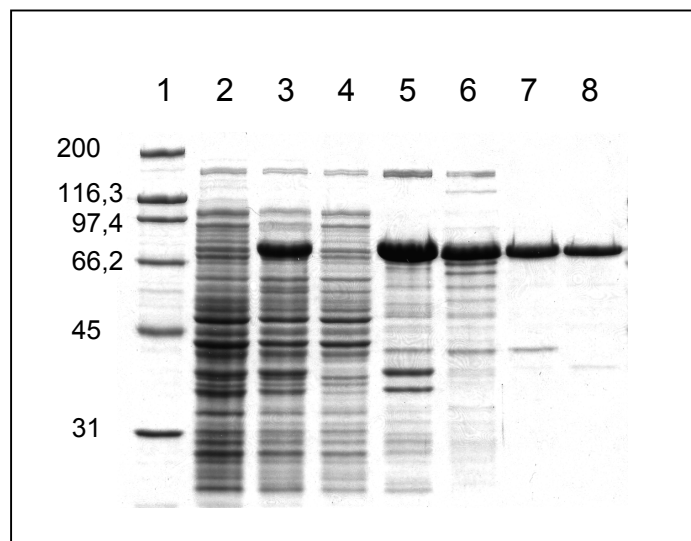


Abb. 3.27: Dokumentation der einzelnen Schritte bei der σ^{54} -Aufreinigung durch ein 10 %iges SDS-PA-Gel. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (links die Größe der Standardproteine in kDa), Spur 2: nicht induzierte, ganze Zellen von TH1 (pFBT19), Spur 3: induzierte, ganze Zellen, Spur 4: klarer Zellextrakt bzw. lösliche Fraktion, Spur 5: unlösliche Fraktion (Pellet nach der Zentrifugation des Rohextraktes), Spur 6: σ^{54} -haltige Proteinlösung nach der Renaturierung, Spur 7: vereinigte, σ^{54} -haltige Fraktionen nach der Heparin-Sepharose-Chromatographie, Spur 8: σ^{54} nach der SP-/Q-Sepharose-Chromatographie.

Zur Kontrolle und Reinheitsbestimmung der σ^{54} -Präparation wurde eine N-terminale Sequenzierung (s. 2.13.6) durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß das σ^{54} -Protein in mindestens 3 Formen vorlag, die sich alle in ihrem N-Terminus unterschieden. Ca. 40 % der Präparation bestand aus dem vollständigen N-Terminus mit dem Start-Methionin (MAPSL...), während bei ca. 10 % des Proteins das Start-Methionin entfernt worden ist (APSL...). Den größten Teil (ca. 50 %) des σ^{54} -Proteins bildete eine Form, bei der die ersten beiden AS entfernt worden sind (PSL...). Verantwortlich für diese Prozessierung von σ^{54} könnte die

FtsH-Protease sein, die in noch unbekannter Weise die Aktivität von σ^{54} steuert (Carmona & de Lorenzo, 1999).

3.5 Aufreinigung von nativer RNA-Polymerase (Core-Enzym) aus *P. putida* KT2442

Die Aufgabe der RNA-Polymerase (RNAP) ist es, die DNA-Sequenz von Genen in mRNA zu transkribieren. Da in den meisten Fällen die Translations- bzw. Syntheseraten von Proteinen relativ konstant sind, ist somit meist die Regulation der Transkriptionsaktivität der RNAP maßgeblich für die Expression der jeweiligen Gene. Hierbei ist die RNAP Empfänger verschiedener Signale, die die Transkription beeinflussen. Beispielsweise können Proteine, die mit der RNAP wechselwirken, die Transkription von Genen beeinflussen (Ishihama, 1993).

Anders als bei den σ^{70} -RNAP-abhängigen Promotoren ist die RNAP im Komplex mit dem σ^{54} -Faktor transkriptionsinaktiv, wenn es an die Consensussequenzen der σ^{54} -Promotoren (bei -12/-24 bp) gebunden ist. Erst der Kontakt mit einem aktivierten Regulatorprotein (XylR im Falle der Promotoren Pu und Ps1) bewirkt einen ATP-abhängigen Aktivierungsprozeß, der den Start der Transkription auslöst (Kustu *et al.*, 1989; Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996b).

Das RNAP-Core Enzym besteht bei Eubakterien aus den 4 Untereinheiten α_2 , β und β' . Bei *E. coli* liegt das Molekulargewicht bei 36,5 kDa für α sowie 151 kDa für β und 155 kDa für β' (Polyakov *et al.*, 1995). Sigma-Faktoren, die für die spezifische Erkennung von Promotoren verantwortlich sind, binden eher schwach an das Core-Enzym und bilden mit den übrigen Untereinheiten das Holoenzym (Hermann & Chamberlin, 1988). 90-95 % des Holoenzym in *E. coli* enthalten den Standard- σ^{70} -Faktor (Wellington & Spiegelman, 1991), der Rest enthält alternative Sigma-Faktoren, wie z.B. σ^{54} (σ^N), σ^{32} (σ^H) oder σ^{38} (σ^S).

Protokolle für die Aufreinigung des RNAP-Holoenzym aus *Pseudomonas* wurden bereits veröffentlicht (Allan & Kropinski, 1987; Johnson *et al.*, 1971). Fujita & Amemura (1992) beschrieben die Aufreinigung des Holo- sowie des Core-Enzym von *P. putida*. Vorversuche zur Aufreinigung des Core-Enzym von *P. putida* KT2442, bei denen das Protokoll der zuletzt genannten Autoren verwendet wurden, waren zwar erfolgreich, allerdings war die Ausbeute des Proteins sehr gering, so daß nicht genug Material für die geplanten *in vitro*-Transkriptionsversuche zur Verfügung stand. Das lag vor allem an dem Konzept des Protokolls, zunächst das Holoenzym aufzureinigen und dann durch eine zweifache Phosphocellulose-Chromatographie den Sigma-Faktor vom Core-Enzym zu lösen.

Säulenchromatographie mit Phosphocellulose ist hierbei schwierig, da die RNAP nur sehr schwach an diesem Material bindet und daher die Chromatographie nur bei einer sehr geringen Flußrate durchgeführt wird (Burgess & Travers, 1971). RNAP bindet an Phosphocellulose aufgrund deren struktureller Ähnlichkeit zu DNA (Affinitätschromatographie), dem wirkt allerdings die gegenseitige Abstoßung des insgesamt negativ geladenen RNAP-Proteins und der negativ geladenen Phosphatgruppen der Phosphocellulose entgegen.

Um die hohen Proteinverluste bei der Phosphocellulose zu umgehen, wurden im modifizierten Protokoll bereits bei der Heparin-Sepharose-Chromatographie Fraktionen mit überwiegend RNAP-Core-Enzym von Fraktionen, die hauptsächlich das Holoenzym enthielten, getrennt. Diese Eigenschaft des Heparins, die beiden Formen der RNAP zu trennen, wurde von Wellington & Spiegelman (1991) beschrieben. Zur vollständigen Entfernung des Sigma-Faktors war dann im letzten Schritt nur einmal die Durchführung einer Phosphocellulose-Chromatographie notwendig.

Das modifizierte und optimierte Aufreinigungsprotokoll ist unter 2.13.1.3 aufgeführt. Bei der Polymin P-Präzipitation wurde in Vorversuchen die für den Wasch-Schritt optimale NaCl-Konzentration von 0,3 ermittelt, bei der die RNAP noch präzipitiert bleibt. In Abb. 3.29 ist zu sehen, daß nach der Polymin P-Präzipitation in dem Eluat mit 1 M NaCl eine Anreicherung der RNAP stattgefunden hat. Nach der Ammoniumsulfat-Fraktionierung wurde zur Vorreinigung eine DEAE-Sepharose-Chromatographie durchgeführt. Hierbei wurde eine 20 ml-Säule gepackt und nachdem die Proteinlösung in Startpuffer (PB-Puffer mit 0,1 M NaCl, s. 2.13.1.3) auf die Säule gegeben wurde, wurde gebundenes Protein mit einem 200 ml-Gradient von 0,1 M bis 1,0 M NaCl in PB-Puffer eluiert. Die RNAP eluierte dabei hauptsächlich zwischen 0,2 M und 0,3 M NaCl.

Im nächsten Schritt wurde nach der Dialyse der RNAP-haltigen Fraktionen eine Chromatographie auf einer 12 ml-Heparin-Sepharose-Säule durchgeführt. Die gegen PB-Puffer mit 0,1 M NaCl dialysierte Proteinlösung (27 ml) wurde mit 1 ml/min auf die Säule gegeben und nach dem Waschen wurde das gebundene Protein durch einen Gradienten (0,1 M-1,0 M NaCl in PB-Puffer) eluiert. Wie in Abb. 3.28 zu sehen ist, eluieren das RNAP-Core-Enzym und das Holoenzym bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Während das Core-Enzym zwischen in den Fraktionen 12-16 (0,3 M – 0,4 M NaCl) war das Holoenzym vor allem in den Fraktionen 17-25 (0,4 M – 0,6 M NaCl) zu finden. In Abb. 3.28 beginnt die Elution des Holoenzym mit dem Erscheinen des σ -Faktors (Fraktionen 21-25 sind hier nicht mehr zu sehen).

Die Fraktionen 12-15, welche hauptsächlich das Core-Enzym enthalten, wurden vereinigt, gegen PB-Puffer mit 0,1 M NaCl dialysiert und anschließend in einer Q-Sepharose-Chromatographie weiter aufgetrennt, um noch verbleibende Sigma-Faktoren vollständig zu entfernen. Q-Sepharose ist ein starker Anionenaustauscher, mit dem der Sigma-Faktor von der

übrigen RNAP entfernt werden kann (M. Buck, Imperial College of Science, London, England; pers. Mitteilung). Wie Abb. 3.29 zeigt, ist der Effekt der Q-Sepharose allerdings gering. Die Laufbedingungen für die Q-Sepharose-Chromatographie waren die gleichen wie bei der Heparin-Chromatographie und die RNAP eluierte bei einer NaCl-Konzentration von 0,3 M bis 0,4 M.

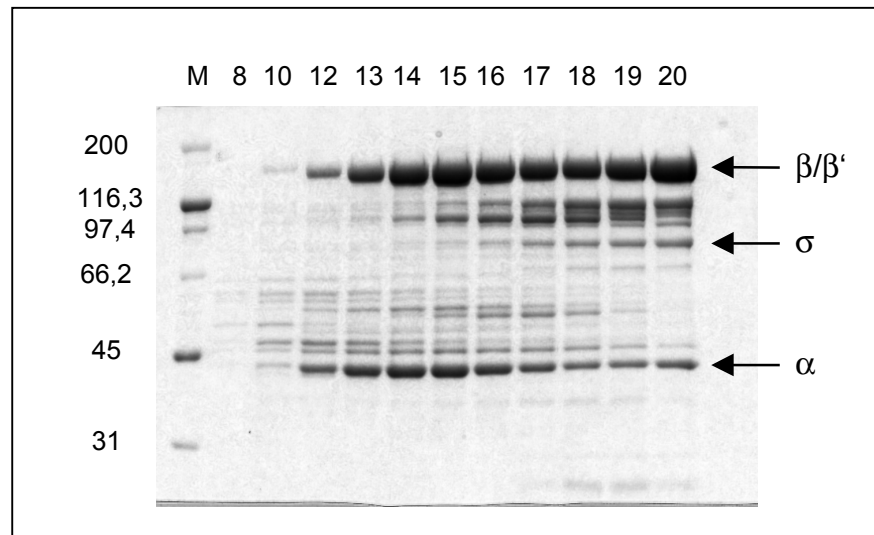


Abb. 3.28: Analyse der Fraktionen 8-20 der Heparin-Sepharose-Chromatographie auf einem 8 %igen SDS-PA-Gel. Spur M: Molekulargewichtsmarker (links die Größe der Standardproteine in kDa). Die Positionen der α , β , β' und σ -Untereinheiten der RNAP sind durch Pfeile markiert.

Um schließlich noch verbleibende Reste des Sigma-Faktors aus der RNAP-Präparation zu entfernen, wurde sie mit einer Phosphocellulose-Säule weiter gereinigt. Eine 8 ml-Säule wurde mit der Phosphocellulose gepackt, die zuvor, wie unter 2.13.2.2 beschrieben, vorbereitet wurde. Nachdem die Säule mit Puffer C (20 mM Tris·HCl (pH 7,9), 0,1 mM EDTA, 50 mM KCl, 1 mM β -Mercaptoethanol, 5 % (v/v) Glycerin) äquilibriert wurde, wurden die ca. 8 ml RNAP-Lösung (RNAP-haltige Fraktionen aus der Q-Sepharose-Chromatographie dialysiert gegen Puffer C) bei einer Flußrate von 0,1 ml/min auf die Säule gegeben. Gebundenes Protein wurde dann mit einem 100 ml-Gradienten von 50 mM bis 500 mM KCl in Puffer C eluiert. Die RNAP, welche von der Phosphocellulose-Säule bei einer Konzentration von 0,15 M bis 0,2 M KCl eluierte, war schließlich frei von Sigma-Faktoren und enthielt zu über 90 % reines RNAP-Core-Enzym (Abb. 3.29).

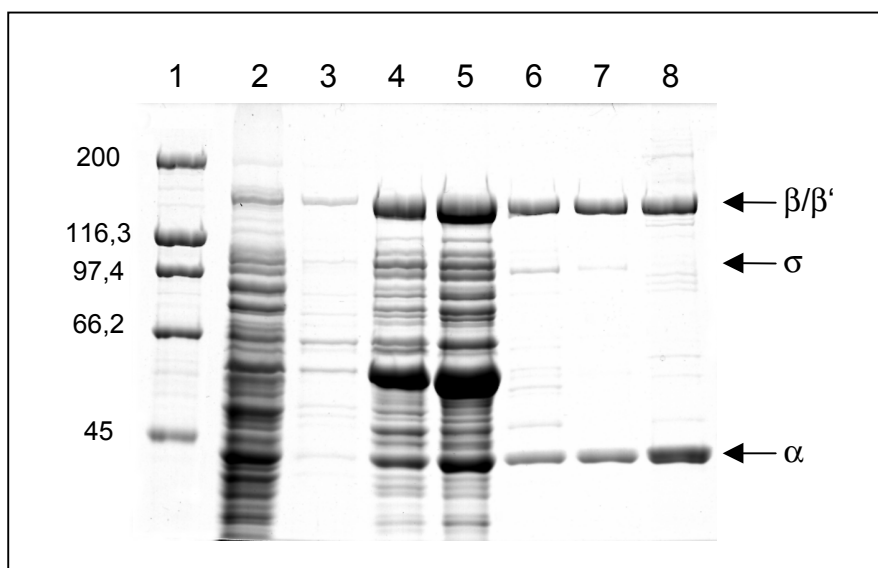


Abb. 3.29: Dokumentation einzelner Schritte bei der RNAP-Aufreinigung aus *P. putida* KT2442 auf einem 8 %igen SDS-PA-Gel. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (links die Größe der Standardproteine in kDa), Spur 2: klarer Extrakt von *P. putida* KT2442, Spur 3: 1,0 M NaCl-Eluat nach der Polymin P-Präzipitation, Spur 4: nach der Ammoniumsulfat-Fraktionierung, Spur 5: RNAP-haltige Fraktionen nach der DEAE-Sepharose-Chromatographie, Spur 6: nach der Heparin-Sepharose-Chromatographie, Spur 7: nach der Q-Sepharose-Chromatographie, Spur 8: nach der Phosphocellulose-Chromatographie. Die Positionen der α , β , β' und σ -Untereinheiten der RNAP sind durch Pfeile markiert.

3.6 *In vitro*-Untersuchung der Transkriptionsaktivität der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 mit aufgereinigten Proteinen aus *P. putida*

Mit den in dieser Arbeit aufgereinigten und teilweise charakterisierten Proteinen aus *P. putida* war es möglich, spezifische Aspekte der Aktivierung der Promotoren Pu und Ps1 zu untersuchen. So war vor allem die Rolle der Histon-ähnlichen Proteine IHF sowie HU bzw. HupB und HupN zu analysieren, die die Ausbildung der für die Transkription von Pu und Ps1 notwendigen DNA-Protein-Promotor-Strukturen unterstützen und auf diese Weise Transkriptionsaktivitäten modulieren.

Essentiell für den Start der Transkription an Promotoren ist der Übergang vom geschlossenen in den offenen Komplex. Im Gegensatz zu dem σ^{70} -RNAP-Holoenzym kann

das σ^{54} -RNAP-Holoenzym diesen Übergang allein nicht katalysieren. Erst durch den Kontakt eines stromaufwärts gebundenen Aktivator-Proteins mit der σ^{54} -RNAP wird in einem ATP-abhängigen Prozeß die Bildung des offenen Komplexes und damit die Transkription eingeleitet (Gralla & Collado-Vides, 1996; Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996b). Der Kontakt zwischen dem Aktivator-Protein und der RNAP kommt zustande, indem die DNA-Region zwischen der Bindungssequenz des Aktivators (UAS) und der -24/-12-Region eine Schleife bildet (s. Abb. 1.3). Im Fall von Pu wird die Schleifenbildung durch die Bindung des IHF-Proteins in dieser Region bewirkt, wobei IHF zudem noch die Bindung der σ^{54} -RNAP an die -24/-12-Region verstärkt (Bertoni *et al.*, 1998; De Lorenzo *et al.*, 1991). In Ps1 weist die Region zwischen der UAS und der -24/-12-Region bereits einen schwach ausgeprägten Knick auf, der durch die Bindung von HU hier noch weiter verstärkt wird (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). Auch IHF bindet zusätzlich zu HU in der Ps1-Promotorregion, wobei IHF anders als in Pu eine gewisse Repression der Transkription zu Folge hat (Marqués *et al.*, 1998).

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Transkriptionssystem sollte untersucht werden, inwieweit *in vivo*-Versuche in *P. putida* und in *E. coli* bzw. *in vitro*-Versuche mit heterologen *E. coli*-Komponenten sich im verlässlicheren *in vitro*-System mit ausschließlich *P. putida*-Komponenten bestätigen lassen. Spezifische Fragestellungen zur Regulation der Promotoren Pu und Ps1, die ja auf dem TOL-Plasmid (pWW0) des Bodenbakteriums *P. putida* lokalisiert sind, lassen sich mit einem reinen *P. putida*-System realistischer untersuchen als mit einem heterologen *in vitro*-System, das Komponenten des Darmbakteriums *E. coli* enthält, welches aus einem ganz anderen Habitat mit sicher anderen regulatorischen Anforderungen stammt.

3.6.1 Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen und Konzentrationen der Komponenten

Das unter 2.15.2 aufgeführte Protokoll zur Durchführung der *in vitro*-Transkription basiert auf dem von Pérez-Martín & de Lorenzo (1996a) angegebenen Verfahren. In Vorversuchen wurden verschiedene Konzentrationen an RNA-Polymerase-Core-Enzym eingesetzt, wobei die *P. putida*-Präparation im Vergleich zu kommerziell erhältlicher *E. coli*-RNA-Polymerase eine deutlich geringere spezifische Aktivität aufwies. Daher wurde in den *in vitro*-Transkriptionstests die RNAP in einer Konzentration von 400-500 nM eingesetzt (statt nur 25-50 nM *E. coli*-RNAP pro 50 µl-Ansatz nach Pérez-Martín & de Lorenzo (1996a)). Entsprechend der Konzentration an RNAP wurden 1,8 µM σ^{54} verwendet, da Sigma-Faktoren üblicherweise in 2-3-fachem Überschuß eingesetzt werden (M. Carmona, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien; pers. Mitteilung). Die σ^{54} -Präparation war allerdings durchaus auch in deutlich geringeren Konzentrationen (350 nM) aktiv, wie Vorversuche mit *E. coli*-RNAP zeigten.

Das Aktivator-Protein XylR, welches für die Aktivierung von Pu und Ps1 notwendig ist, wurde bereits *in vitro* charakterisiert (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996a). Hierbei wurde eine verkürzte Variante von XylR, XylR Δ A, untersucht, bei der die intramolekulare Repressordomäne A entfernt wurde, die erst nach Bindung eines Effektors (z. B. Toluol) die Aktivierung des Proteins erlaubt. Aufgrund dieser Modifikation ist XylR Δ A (freundlicherweise von V. de Lorenzo, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien, zur Verfügung gestellt) konstitutiv aktiv und auf das Hinzufügen eines Effektors konnte in den *in vitro*-Transkriptionsexperimenten verzichtet werden.

Die Konzentrationsangaben für HupB, HupN und IHF in allen *in vitro*-Transkriptionsexperimenten beziehen sich immer auf das Dimer. Weiterhin wurde im allgemeinen die *in vitro*-Transkription bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt, da bei geringeren Temperaturen schwächere Signale bzw. geringere Transkriptionsaktivitäten festgestellt wurden.

Als DNA-Template wurden zirkuläre, superhelikale (supercoiled) Plasmide eingesetzt, um der *in vivo*-Situation in der Bakterienzelle zu entsprechen. Diese Plasmide (pEZ10 (mit Pu) bzw. pTE103-Ps) lagen vor als pTE103-Abkömmlinge, in denen Pu- bzw. Ps-Promotorfragmente kloniert wurden. Der Vektor pTE103 besitzt stromabwärts vom Polylinker einen starken Transkriptionsterminator, der ein Weiterlaufen der RNAP verhindert und somit die Synthese der mRNA an einer definierten Stelle stoppt.

Die erhaltenen Transkripte hatten eine Länge von jeweils ca. 300 b. Auf eine genaue Identifizierung mittels Längenmarker wurde verzichtet, da eindeutig nur in Anwesenheit von Xyl Δ A spezifische Transkripte erhalten wurden, die sich deutlich von unspezifischen in der Länge unterscheiden.

3.6.2 Einfluß von HupB, HupN und IHF auf die Transkriptionsaktivität von Ps1

In diesen Experimenten wurde der Einfluß von HupB bzw. HupN und IHF auf die Transkription von Ps1 untersucht. Pérez-Martín & de Lorenzo (1995a) hatten beschrieben, daß in *E. coli*-HU-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp die Ps1-Aktivität drastisch verringert ist. Neben diesem stimulierenden Effekt von HU konnte dagegen für IHF kein Einfluß auf die Ps1-Aktivität festgestellt werden. Holtel *et al.* (1995) und Marqués *et al.* (1998) berichteten dagegen, daß IHF einen negativen Effekt auf die Aktivierung von Ps1 zu haben scheint.

In dem ersten *in vitro*-Transkriptionsexperiment wurden neben der σ^{54} -RNAP und XylR Δ A verschiedene Konzentrationen an HupB, HupN bzw. einer Mischung aus gleichen Teilen an HupB und HupN verwendet. Wie in Abb. 3.30 zu sehen ist, wird das Transkript nur in Anwesenheit von XylR Δ A gebildet. Mit XylR Δ A, aber ohne Zugabe von HU-Protein fand eine geringe Transkription ausgehend von Ps1 statt (0,6 relative Einheiten). Das Hinzufügen von HupB im Konzentrationsbereich von 50 – 300 nM führte zu einer tendenziell zunehmenden Transkriptionsaktivität, so daß sie mit 300 nM HupB bei 1,4 relativen Einheiten

(RE) lag. Dagegen waren mit HupN in dem getesteten Konzentrationsbereich konzentrationsunabhängige, relativ hohe Transkriptionsraten (um 1,7 RE) zu beobachten, da möglicherweise der Sättigungsbereich für HupN erreicht wurde. Die spezifische Transkriptionaktivität lag damit etwas höher als bei HupB, d.h. im Vergleich zu HupB besitzt HupN somit eine höhere spezifische Aktivität in der Stimulation der Ps1-Aktivierung.

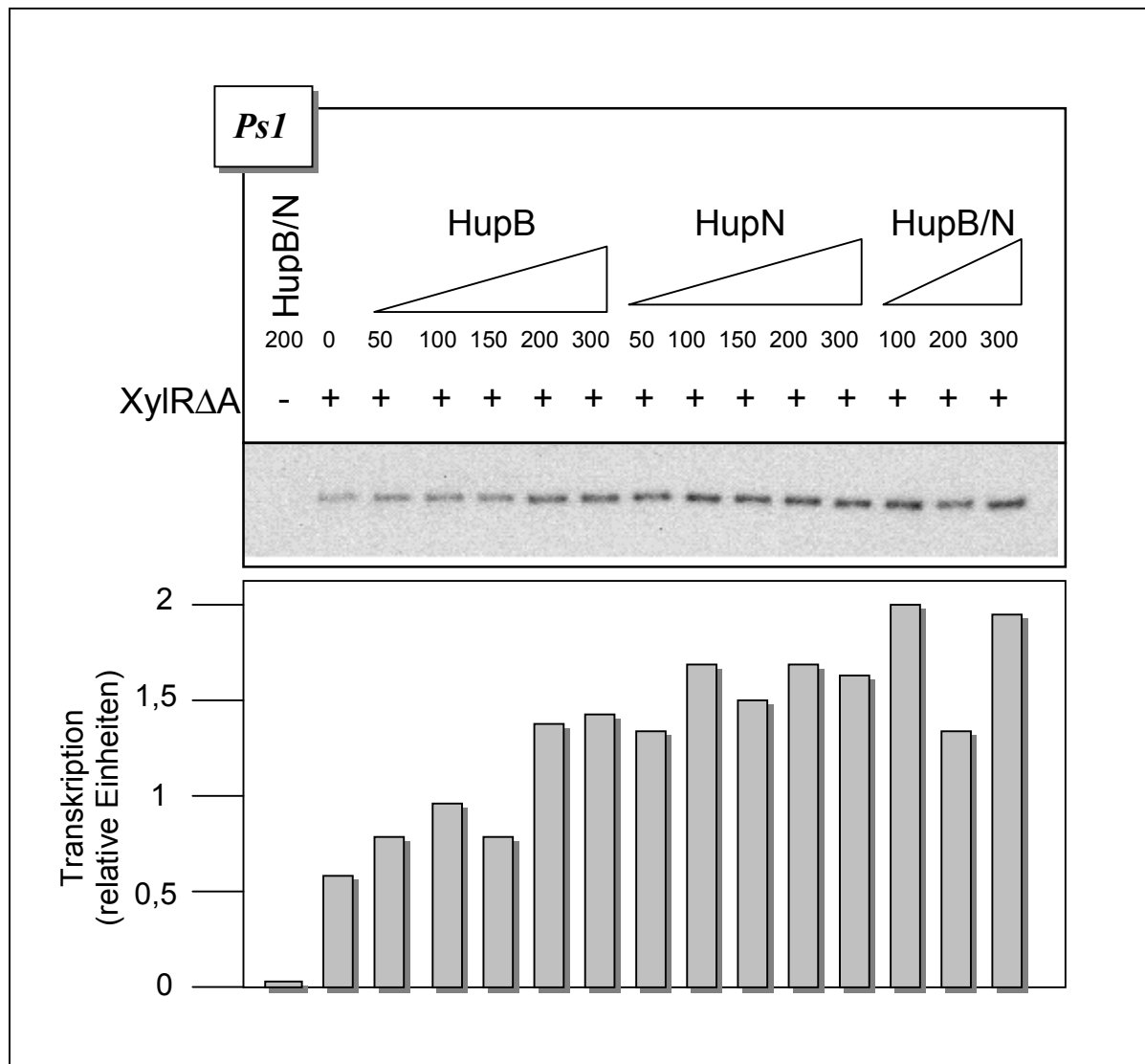


Abb. 3.30: Einfluß von HupB und HupN auf die Aktivierung von Ps1. Jeweils ansteigende Konzentrationen an HupB, HupN oder einer Mischung aus HupB und HupN (HupB/N) wurden eingesetzt. Die Zahlen geben die Konzentrationen der Proteine in nM an. Die Zugabe von 400 nM XylRΔA ist durch „+“ gekennzeichnet. Die Intensität der radioaktiven Signale, die proportional zur Menge an gebildetem Transkript ist, wurde densitometrisch bestimmt (s. 2.15.2) und ist hier in relativen Einheiten (RE) wiedergegeben.

Da in der *P. putida*-Zelle beide HU-Gene, *hupB* und *hupN*, exprimiert werden (s. 3.1.5), wurde eine 1:1-Mischung beider Hup-Proteine getestet. Die HupB/HupN-Mischung wurde für 10 min bei 37 °C vorinkubiert, um ggf. die Bildung von HupB/HupN-Heterodimeren zu ermöglichen. Dieses Verfahren zur Bildung von heterodimeren HU-Proteinen aus homodimeren Präparationen wurde bereits für das *E. coli*-HU-Protein angewendet (Alonso *et al.*, 1995). Die HupB/HupN-Mischung wurde in den Konzentrationen 100, 200 und 300 nM eingesetzt, wobei sich beispielsweise die 200 nM Mischung aus jeweils 100 nM HupB und HupN (also 200 nM in der Summe beider Hup-Proteine) zusammensetzt. Mit 100 nM HupB/HupN wurde eine Ps1-Transkriptionsaktivität von 2,0 RE erreicht, die somit die für HupB oder HupN allein ermittelten Werte klar übersteigt. Mit 300 nM HupB/HupN wurde ein ähnlich hoher Wert (1,9 RE) wie bei 100 nM erreicht, was auf Sättigungseffekte hinweist. Insgesamt hat die HupB/HupN-Mischung einen größeren Effekt auf die Ps1-Aktivierung als jeweils HupB oder HupN allein. Der geringe Wert von 1,3 bei 200 nM HupB/HupN ist wohl als experimentelle Abweichung anzusehen.

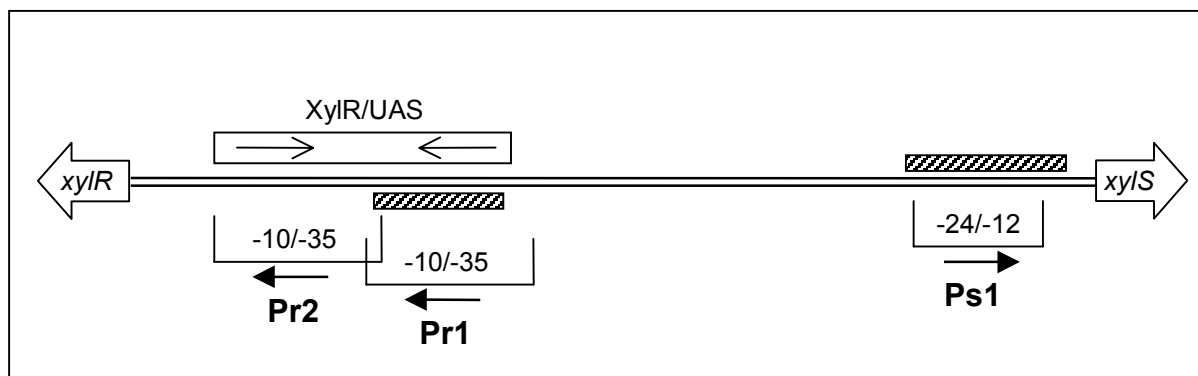


Abb. 3.31: Bindung von IHF in der Pr-Ps-Promotorregion. Schematische Darstellung der Pr-Ps-Region als doppelsträngige DNA (Doppellinie) mit den *xyIR*-Promotoren Pr1 und Pr2 sowie dem divergenten, σ^{54} -abhängigen *xyIS*-Promotor Ps1 (die Abstände zwischen den Elementen sind nicht realistisch). Die Bindungsregionen von IHF sind als schraffierte Balken dargestellt. Die Bindungsregion von XylR (UAS = upstream activating sequence) enthält invertierte Sequenzwiederholungen und ist dementsprechend als Rechteck mit aufeinander zugerichteten Pfeilen gekennzeichnet.

In weiteren Experimenten wurde dann der Einfluß von HupB/HupN und IHF auf die Ps1-Aktivität in Gegenwart dieser beiden Faktoren zusammen ermittelt. Hiermit sollte geklärt werden, ob in der Tat ein negativer Effekt von IHF auf die Ps1-Transkriptionsaktivität bei Anwesenheit von HU (HupB/HupN) zu beobachten ist, wie *in vivo* in *E. coli* (Holtel *et al.*, 1995) und in *P. putida* KT2440 mit Hilfe von Primer-Extension-Experimenten festgestellt

wurde (Marqués *et al.*, 1998). Wie Holtel *et al.* (1995) beschrieben, bindet *E. coli*-IHF an zwei Regionen in dem Pr-Ps-Promotorbereich: in der XylR-Bindestelle (UAS des Ps1-Promotors) und im Bereich der -24/-12-Region des Ps1-Promotors (Abb. 3.31). Eine Bindung von IHF an diese Regionen würde in beiden Fällen theoretisch zu einer Repression der *xylS*-Expression führen, was auch *in vivo* bestätigt werden konnte.

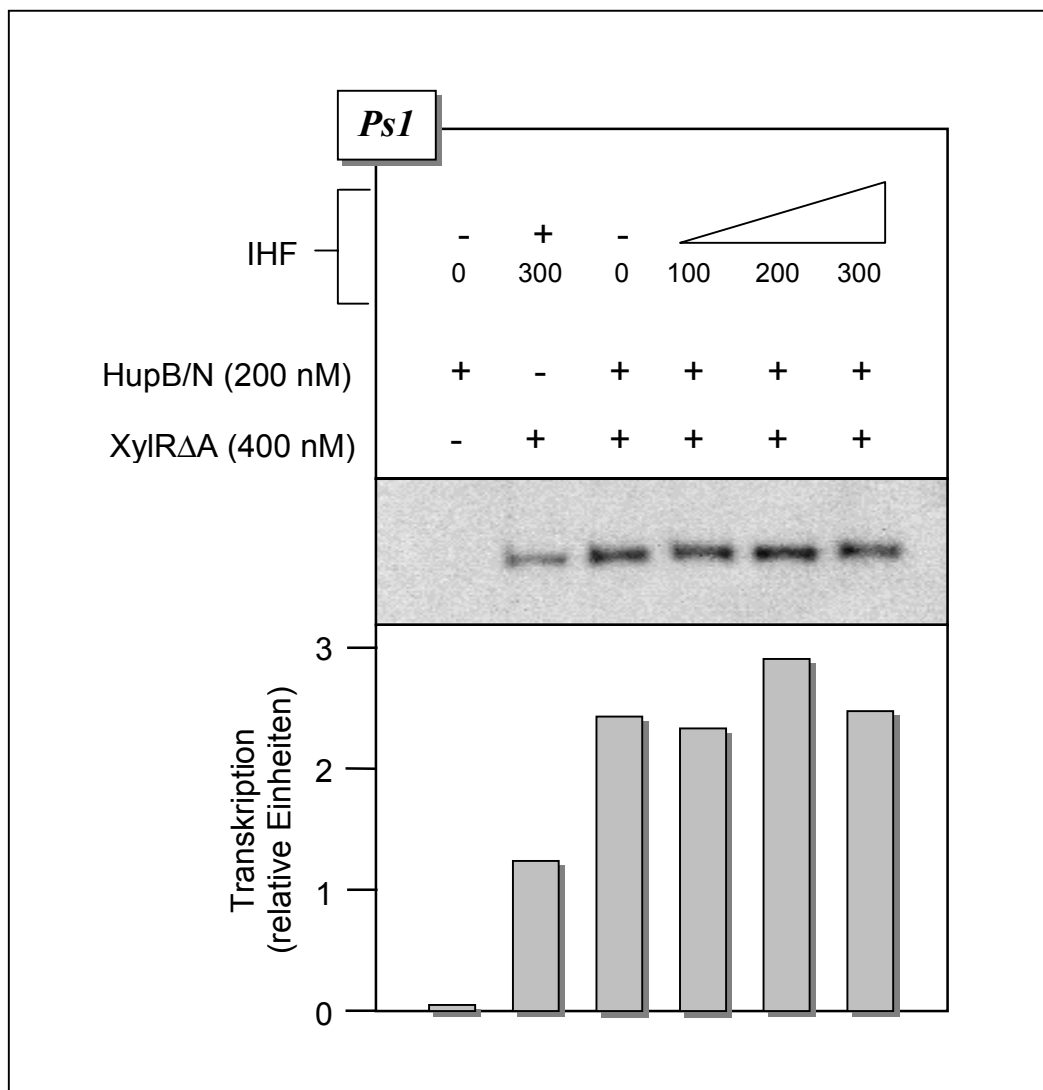


Abb. 3.32: Einfluß von IHF auf die Ps1-Aktivierung. Es wurden ansteigende Konzentrationen an IHF eingesetzt. Die An- oder Abwesenheit von 200 nM HupB/N oder 400 nM XylRΔA bzw. 300 nM IHF ist durch „+“ oder „-“ gekennzeichnet. Weitere Einzelheiten siehe Abb. 3.30.

In Abb. 3.32 ist zu sehen, daß in der Negativkontrolle des *in vitro*-Transkriptionsexperiments mit 200 nM HupB/HupN, aber ohne XylRΔA kein Transkript erhalten wurde. Erst durch Zugabe von XylRΔA wurde mit 200 nM HupB/HupN eine Ps1-Aktivität von 2,4 (RE)

erreicht. Wurden anstelle von HupB/HupN 300 nM IHF eingesetzt, konnte eine Ps1-Aktivität von 1,3 erhalten werden, die damit fast um die Hälfte geringer war, als mit 200 nM HupB/HupN. Ob allerdings die Basalaktivität, d.h. nur mit XylR Δ A allein, höher oder geringer ist als mit IHF, wurde hierbei nicht ermittelt. Zu Ansätzen, die alle 200 nM HupB/HupN enthielten, wurden unterschiedliche Konzentrationen an IHF hinzugefügt. In dem getesteten IHF-Konzentrationsbereich von 100 bis 300 nM blieb die Ps1-Aktivität im Mittel auf dem Niveau wie bei dem Ansatz ohne IHF, d.h., daß IHF keinen negativen Effekt auf die Aktivierung von Ps1 ausübt. Mit diesem *P. putida*-*in vitro*-Transkriptionssystem konnten somit die Ergebnisse von Holtel *et al.* (1995) und Marqués *et al.* (1998) nicht bestätigt werden.

3.6.3 Einfluß von HupB, HupN und IHF auf die Transkriptionsaktivität von Pu

Der Pu-Promotor ist in hohem Maße abhängig von IHF (De Lorenzo *et al.*, 1991). Die Bindung von IHF an seiner spezifischen Erkennungssequenz zwischen der -24/-12-Region und dem weiter stromaufwärts gebundenen XylR-Protein (s. Abb. 3.24 in Kapitel 3.3.4) bewirkt eine Konformation der DNA, die den optimalen Kontakt zwischen XylR und der RNAP ermöglicht (Pérez-Martín *et al.*, 1994). Darüber hinaus verstärkt IHF die Bindung der RNAP an die -24/-12-Region (Bertoni *et al.*, 1998). Diese beiden Funktionen von IHF erklären hinreichend die Notwendigkeit von IHF für die maximale Aktivierung von Pu.

Wie in Abb. 3.33 zu sehen ist, wurde in den *in vitro*-Transkriptionsexperimenten die Pu-Aktivität bei steigender IHF-Konzentration gemessen. Ohne IHF besitzt Pu eine Grundaktivität von 0,5 RE. In dem Konzentrationsbereich 50 – 150 nM IHF steigt die Pu-Aktivität an, bis sie zwischen 200 und 300 nM annähernd ein Plateau bei 1,3 RE erreicht. Weiterhin wurde die Pu-Aktivität bei gleichzeitiger Anwesenheit von IHF und HupB/HupN bestimmt, um die Situation in der *P. putida*-Zelle zu simulieren. Hierzu wurde bei einer konstanten IHF-Konzentration von 300 nM der Einfluß einer steigenden HupB/HupN-Konzentration auf die Pu-Transkriptionsaktivität untersucht. In dem getesteten Konzentrationsbereich von 50 – 300 nM HupB/HupN lagen alle erhaltenen Aktivitäten mit 1,8 bis 2,2 RE deutlich höher als ohne Hup-Proteine. Dieses Ergebnis zeigt, daß zumindest *in vitro* bei gleichzeitiger Anwesenheit von IHF und HupB/HupN höhere Pu-Aktivitäten erreicht wurden als in Gegenwart von IHF allein. Im Mittel wurde bei ansteigender HupB/HupN-Konzentration zwar auch tendenziell ein Anstieg in der Pu-Aktivität beobachtet, jedoch gab es experimentelle Varianzen, die hier eine validierte Aussage letztlich nicht erlauben.

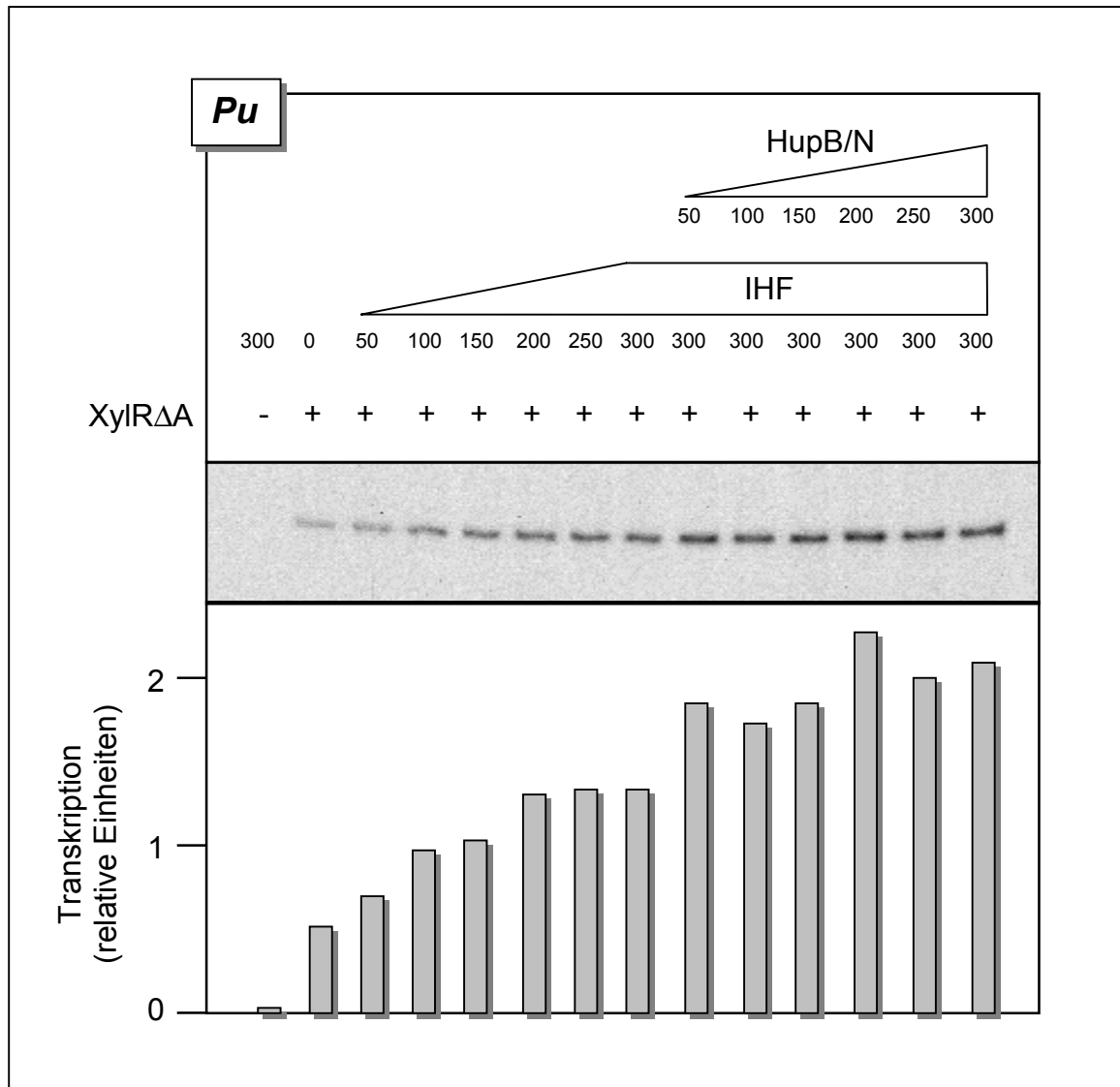


Abb. 3.33: Einfluß von IHF sowie IHF zusammen mit HupB/HupN auf die Pu-Aktivierung. Es wurden ansteigende Konzentrationen an IHF sowie konstante Konzentrationen an IHF plus ansteigende Konzentrationen an HupB/N eingesetzt. Weitere Einzelheiten siehe Abb. 3.30.

Um den in Abb. 3.33 dargestellten positiven Effekt von HupB bzw. HupN auf die Pu-Transkriptionsaktivität in Abwesenheit von IHF genauer zu untersuchen, wurden jeweils verschiedene Konzentrationen an HupB und HupN getestet (Abb. 3.34). Während ohne Hup-Proteine eine Pu-Aktivität von 2,3 RE gemessen wurde, betrug sie mit 50 nM HupB 4,3 RE. Bei weiterer Erhöhung der HupB-Konzentration wurde ebenso eine Erhöhung der Pu-Aktivität festgestellt, so daß schließlich mit 200 nM HupB 6,2 RE gemessen wurden. In dem Konzentrationsbereich 50 – 200 nM wurde für HupN eine insgesamt sehr hohe Pu-Aktivität von ca. 7 RE festgestellt, die mit zunehmenden HupN-Konzentrationen nur noch leicht zunahm, so daß hier Sättigungseffekte anzunehmen sind. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits beim Ps1-Promotors erhalten (s. 3.6.2).

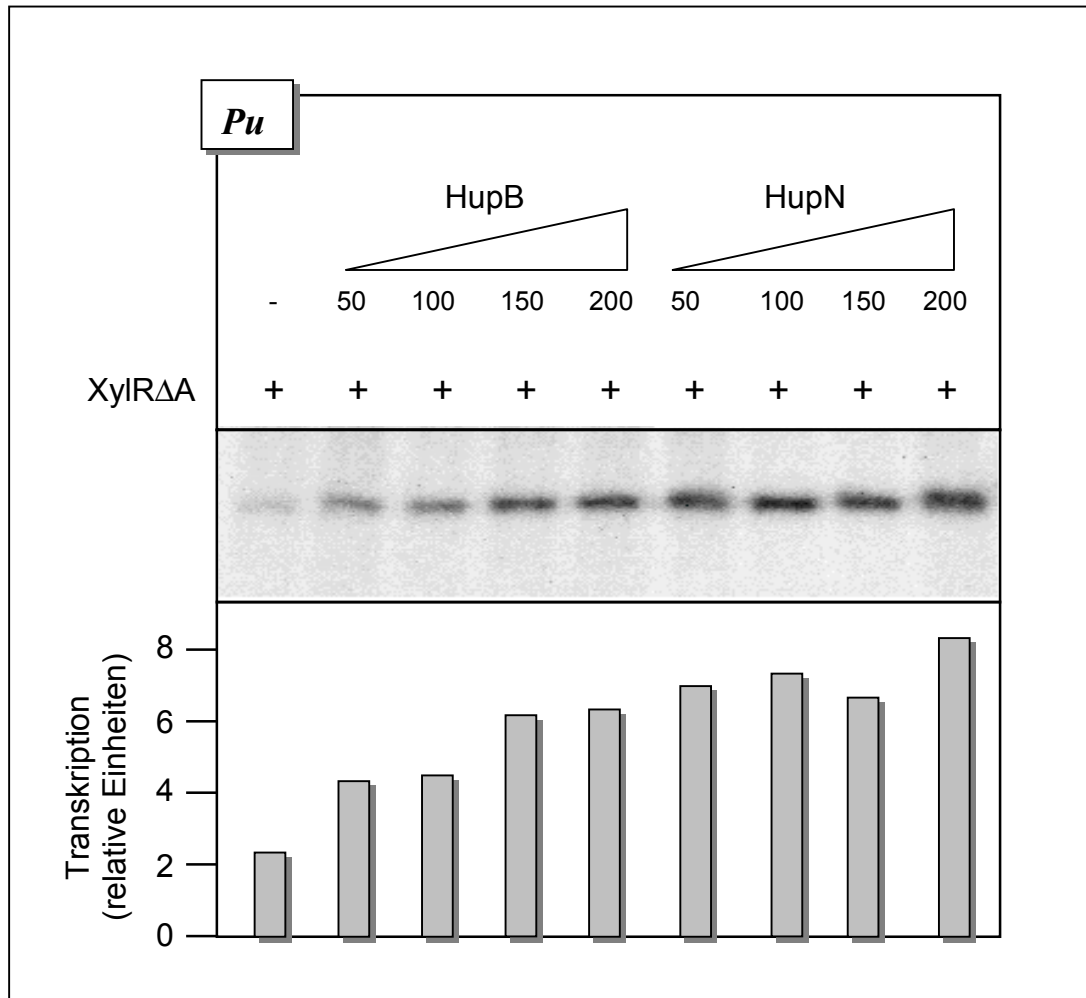


Abb. 3.34: Einfluß von HupB und HupN auf die Aktivierung von Pu. Es wurden ansteigende Konzentrationen an HupB bzw. HupN eingesetzt. Weitere Einzelheiten siehe Abb. 3.30.

3.6.4 Einfluß der Temperatur auf die Aktivierung von Pu und Ps1

Die Expression einer Anzahl bakterieller Gene wird, neben chemischen Substanzen, durch Umweltsignale wie Temperatur, pH-Wert, Druck, Licht und Osmolarität moduliert (z. B. Bartlett *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 1989; Lee & Kaplan, 1992; McIver *et al.*, 1995; Mikulskis *et al.*, 1994). Im Unterschied zu extrazellulären Signalen, die zunächst in intrazelluläre umgewandelt werden müssen, um dann erst auf die Genexpression einwirken zu können, kann die Temperatur als extrazelluläre Umgebungsvariable auch direkt auf die Transkription Einfluß nehmen. Zum einen hat jedes Enzym bzw. Protein sein Temperaturoptimum, zum anderen können sich die Bindungseigenschaften von Protein-DNA- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen temperaturabhängig ändern. Beispielsweise ist die Aktivität des IHF-abhängigen P_L -Promotors des Phagen λ bei niedrigen Temperaturen größer als bei höheren Temperaturen (Giladi *et al.*, 1995). Vermittelt wird dieser Effekt wenigstens zum Teil über erhöhte Affinität von IHF zu seiner Bindungsstelle bei niedrigen Temperaturen.

In *in vitro*-Transkriptionsexperimenten wurde getestet, inwieweit die Aktivitäten der

Promotoren Pu bzw. Ps1 von Temperatureffekten beeinflußt werden. Hierzu wurden die Ansätze bei 37 ° und 20 °C inkubiert. In den Experimenten zur Bestimmung der Pu-Promotor-Aktivität enthielten die Ansätze neben den Standardkomponenten noch 200 nM IHF sowie 200 nM einer HupB/HupN-Mischung (jeweils 100 nM HupB bzw. HupN), welche vor der Zugabe 10 min bei 37 °C vorinkubiert wurde, um die Bildung von HupB/HupN-Heterodimeren ggf. zu ermöglichen. Die Ansätze zur Untersuchung von Ps1 enthielten dagegen kein IHF.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Transkriptionsexperimente sind in Abb. 3.35 wiedergegeben. Die Transkriptionsaktivität von Pu war bei 20 °C um 30 % geringer als bei 37 °C. Die Transkriptionsaktivität von Ps1 zeigte bei 20 °C im Vergleich zu 37 °C eine viel drastischere Abnahme als es beim Pu-Promotor der Fall war. Mit nur 0,8 RE (entspricht 16 % der Aktivität bei 37 °C) war die Temperaturabhängigkeit von Ps1 ca. 5mal größer als die von Pu. Weiterhin zeigte sich beim Vergleich der Promotoraktivitäten von Pu und Ps1 bei 37 °C, daß die Ps1-Aktivität um ca. 34 % höher war. Ps1 ist somit unter diesen Bedingungen der stärkere Promotor. Da *P. putida* als Bodenbakterium eher Umgebungstemperaturen von 20 °C als typischen Körpertemperaturen um 37 °C ausgesetzt sein wird, weisen die hier gewonnenen Ergebnisse auf drastisch geringere *in situ*-Promotoraktivitäten des Ps1-Promotors gegenüber denen des Pu-Promotors hin.

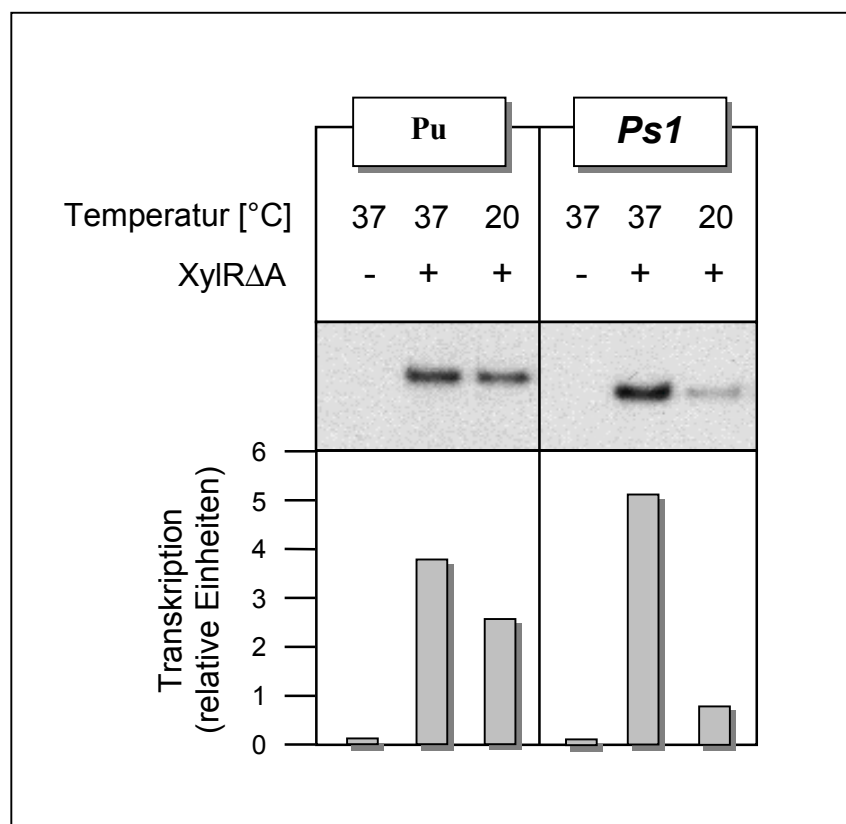


Abb. 3.35: Einfluß der Temperatur auf die Pu- und Ps1-Promotoraktivität. Weitere Einzelheiten siehe Abb. 3.30.

4. Diskussion

4.1 *In vitro*-Transkriptionssystem exklusiv mit *P. putida*-Komponenten

Bereits 1975 wurde der Abbau von Toluol und Xylol durch Enzyme, die auf dem TOL-Plasmid von *Pseudomonas putida* mt-2 codiert sind, beschrieben (Worsey & Williams, 1975). Seitdem hat sich eine große Zahl von Veröffentlichungen mit der Regulation der Expression der an dem Abbau beteiligten Gene befaßt. Daher ist das *xyl*-Operon-System mittlerweile eines der am besten untersuchten Modelle für die Genregulation in Bakterien. Nichtsdestoweniger zeigen die jüngsten Arbeiten zur Regulation der *xyl*-Gene, daß das Wissen über die detaillierte Funktionsweise der beteiligten Promotoren immer noch erweitert werden kann (z.B. Bertoni *et al.*, 1998; Marqués *et al.*, 1999).

Die Untersuchung der Regulation der *P. putida*-*xyl*-Gene *in vivo* erfolgte hauptsächlich in *E. coli*. *In vitro*-Untersuchungen wurden, da entsprechende Proteinkomponenten nur aus *E. coli* oder anderen Enterobakterien verfügbar waren, somit ebenfalls in heterologen Systemen durchgeführt. Das TOL-Plasmid pWW0 läßt sich zwar nach *E. coli* transferieren, jedoch werden die *xyl*-Gene in diesem Wirtstamm nur sehr schwach exprimiert (Benson & Shapiro, 1978; Nakazawa *et al.*, 1978; Jacoby *et al.*, 1978). Franklin *et al.* (1981) vermuteten die Ursache dafür in einem ineffektiven Zusammenspiel der wirtseigenen *E. coli*-Proteine mit den auf *P. putida*-Proteine adaptierten *xyl*-Promotoren. Weiterhin konnten teilweise *in vitro*-Ergebnisse, die mit *E. coli*-Komponenten erhalten wurden, nicht durch *in vivo*-Ergebnisse aus *P. putida* bestätigt werden. Beispielsweise ist die Aktivität des Pu-Promotors in IHF-Mutanten von *P. putida* KT2442 annähernd null (Calb *et al.*, 1996), während sie *in vitro* in Abwesenheit von IHF noch eine signifikante Höhe besitzt (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996a). Daher ergab sich die Notwendigkeit für ein *in vitro*-Transkriptionssystem, das ausschließlich Proteinkomponenten aus *P. putida* enthält. Nur in einem solchen reinen *P. putida*-System ist zu erwarten, daß die tatsächlich in der Zelle stattfindenden Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Proteinen bzw. den Proteinen und den *xyl*-Promotoren realistisch reproduziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher erstmalig *alle* zur Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Ps1 und Pu notwendigen Proteine aus *P. putida* aufgereinigt und dann zu einem funktionsfähigen „reinen“ *P. putida*-*in vitro*-Transkriptionssystem kombiniert. Hierzu war zunächst das dem *E. coli*-HU-Protein homologe Protein aus *P. putida* näher zu charakterisieren, im besonderen lagen bisher auch die hierfür codierenden Gene bisher noch nicht vollständig kloniert vor.

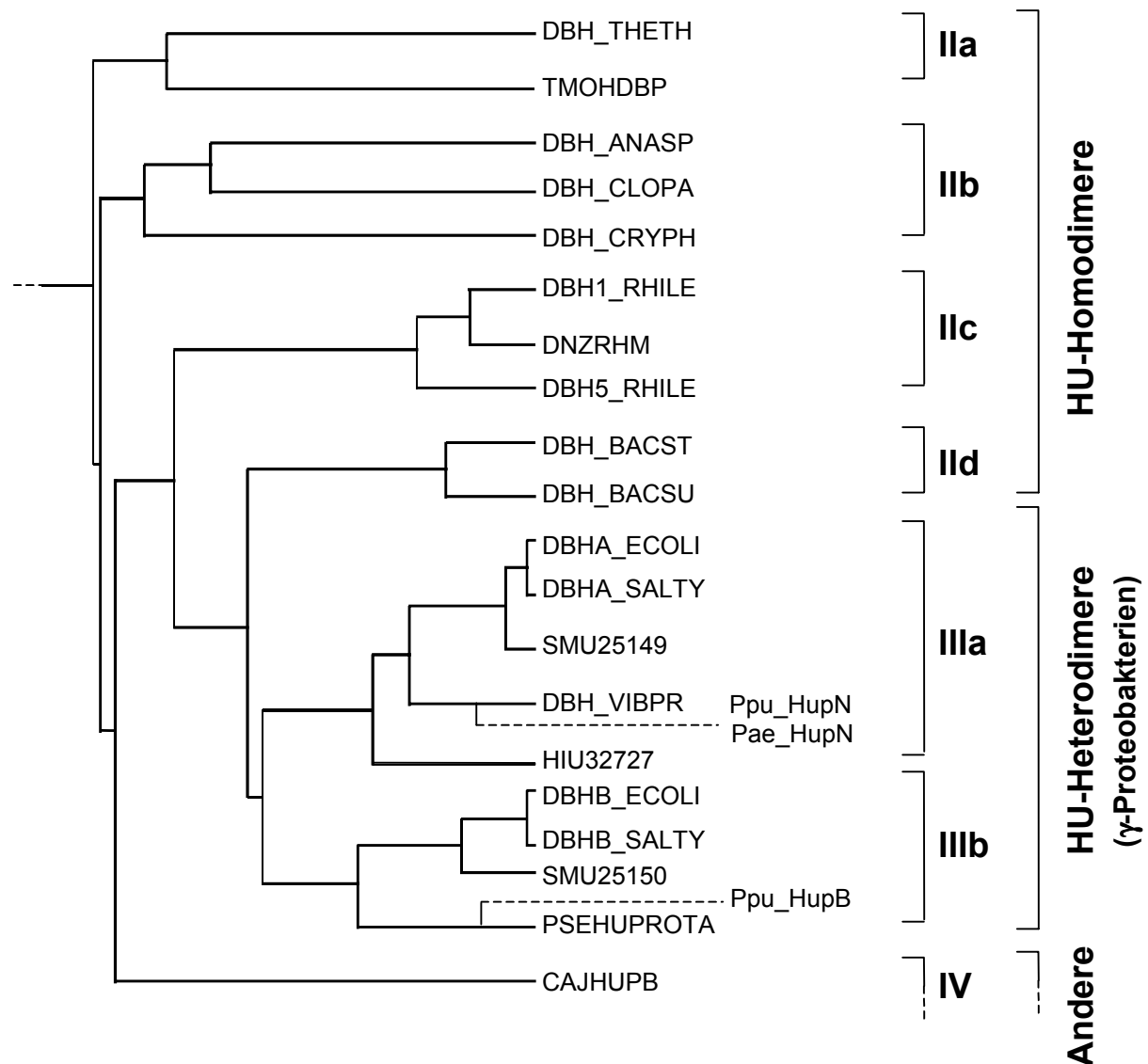


Abb. 4.1: Ausschnitt aus dem phylogenetischen Stammbaum der HU-Proteine (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). Zusätzlich sind die *P. putida*-Proteine HupB (Ppu_HupB) und HupN (Ppu_HupN) sowie HupN aus *P. aeruginosa* (Pae_HupN) an ihrer theoretischen Position eingezeichnet. Die Bezeichnungen der Proteine bedeuten im einzelnen: CAJHUPB (HU β aus *Campylobacter jejuni*), DBH1_RHILE (DNA-binding protein HRL18 aus *Rhizobium leguminosarum*), DBH5_RHILE (DNA-binding protein HRL53 aus *Rhizobium leguminosarum*), DBHA_ECOLI (HU α aus *E. coli*), DBHA_SALTY (HU α aus *Salmonella typhimurium*), DBH_VIBPR (HU aus *Vibrio proteolyticus*), DBHB_ECOLI (HU β aus *E. coli*), DBHB_SALTY (HU β aus *Salmonella typhimurium*), DBH_ANASP (HU aus *Anabaena* sp.), DBH_BACST (DNA-binding protein II (Hb) aus *Bacillus stearothermophilus*), DBH_BACSU (DNA-binding protein II (Hb) aus *Bacillus subtilis*), DBH_CLOPA (HU aus *Clostridium pasteurianum*), DBH_CRYPH (HU aus dem Chloroplasten von *Cryptomonas phi*), DBH_THETH (DNA-binding protein II aus *Thermus aquaticus*), DNZRHM (DNA-binding protein HRM aus *Rhizobium meliloti*), HIU32727 (HU aus *Haemophilus influenzae*), PSEHUPROTA (HU aus *Pseudomonas aeruginosa*), TMOHDBP (HU aus *Thermotoga maritima*), SMU25149 (HU α aus *Serratia marcesens*), SMU25150 (HU β aus *Serratia marcesens*).

4.2 HU aus *P. putida*

Phylogenie der HU-Proteine: homo- und heterodimeres HU

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sowohl *P. putida* wie auch *P. aeruginosa* jeweils zwei HU-Gene, *hupB* und *hupN*, besitzen. Dieser Befund hat Auswirkungen auf die bisherige systematische Anordnung der HU-Proteine entsprechend ihrer Eigenschaften zur Ausbildung von Homo- bzw. Heterodimeren. Oberto & Rouvière-Yaniv hatten die seinerzeit (1996) bekannten HU-Proteine aufgrund ihrer phylogenetischen Beziehungen in die Familien der homodimeren (II), heterodimeren (III) und anderen Proteine (IV) eingeteilt. Hierbei unterteilten sie homodimere HU-Proteine weiter in die Unterfamilien IIa bis IIc und heterodimere HU-Proteine in die Unterfamilien IIIa und IIIb (s. Abb. 4.1). Beispielsweise ist das HU-Protein aus *E. coli* ein Heterodimer bestehend aus HupA und HupB, die zu den Unterfamilien IIIa bzw. IIIb gehören. Aufgrund der Homologie des in dieser Arbeit identifizierten HupB-Proteins aus *P. putida* zu HupB aus *P. aeruginosa* und *E. coli* läßt sich dieses Protein der Unterfamilie IIIb der heterodimeren HU-Proteine zuordnen. Da sich aber die ebenfalls in dieser Arbeit neu beschriebenen HupN-Proteine aus *P. putida* und *P. aeruginosa* keiner der bisher bestehenden Unterfamilien zuordnen lassen, bilden sie eine eigene Gruppe (s. 3.1.4), und zwar innerhalb der Familie der heterodimeren HU-Proteine. Die Abb. 3.8 in Kapitel 3.1.4 legt nahe, daß das Vorhandensein zweier Gene, die für HU-Proteine codieren, eine Eigenschaft der γ -Proteobakterien ist. Bisher war man davon ausgegangen, daß nur Enterobakterien zwei HU-Gene besitzen (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996). Da diese Eigenschaft offenbar auch bei Pseudomonaden anzutreffen ist, stellen die γ -Proteobakterien eine diesbezüglich geeignete systematische Gruppe von Bakterien mit zwei HU-Genen dar, die sowohl die Enterobakterien als auch Pseudomonaden (rRNA-Gruppe I, siehe hierzu Kersters *et al.*, 1996) umfaßt. Wie in Abb. 4.1 dargestellt, gehören die HU-Proteine von *Haemophilus influenzae* und *Vibrio proteolyticus* zur Familie der HU-Heterodimere, obwohl dem widersprechend beide Bakterien nur ein HU-codierendes *hupA*-Gen zu besitzen scheinen, HU demnach also ein Homodimer wäre. Eine Erklärung für diesen Widerspruch könnte sein, daß *H. influenzae* und *V. proteolyticus* ein weiteres HU-Gen besitzen, welches aber wie im Fall von *hupN* aus *P. aeruginosa* und *P. putida* nur geringe Homologie zu bekannten HU-Genen hat und deshalb noch nicht identifiziert werden konnte. Dem steht wiederum entgegen, daß in Homologiesuchen im bereits durchsequenzierten Genom von *H. influenzae* kein weiteres HU-Gen gefunden werden konnte, welches signifikante Ähnlichkeit zu bekannten HU-Genen besitzt. So erbrachte auch die Homologiesuche mit dem *hupN*-Gen im *H. influenzae*-Genom kein signifikantes Ergebnis. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Existenz nur eines HU-Gens in *H. influenzae* und *V. proteolyticus* wäre, daß diese beiden Organismen im Laufe der Evolution bzw. der spezifischen Anpassung an Umweltbedingungen ein ursprünglich vorhandenes zweites HU-Gen verloren haben. Dies würde jedoch bedeuten, daß

die Theorie von Oberto & Rouvière-Yaniv (1996) *nicht* zutrifft, die annimmt, daß durch horizontalen Gentransfer nur eines ursprünglich im Genom vorhandenen *hupA*- oder *hupB*-Gens zwischen Bakterien mit homodimeren HU-Proteinen heterodimere HU-Proteine entstanden sind. Diese Hypothese beruht allerdings auf der falschen Annahme, daß *P. aeruginosa* nur ein *hupB*-Gen enthält, da ja in dieser Arbeit ein *hupN*-Gen auch im *P. aeruginosa*-Genom gefunden wurde.

Die höchste Homologie zu den HupN-Proteinen aus *P. aeruginosa* und *P. putida* hat HupA aus *V. proteolyticus* (s. Abb. 4.1 und 3.1.2), was möglicherweise darauf hindeutet, daß HupN eine ähnliche Funktion wie HupA in der Zelle ausübt. In diesem Fall könnte die Aufgabenteilung der HupB/HupN-Proteine bei den Pseudomonaden die gleiche sein wie beim HupA/HupB-HU-Heterodimer der Enterobakterien, d. h. es stellt sich die Frage, ob HupB und HupN wie im Fall der Enterobakterien Heterodimere bilden. Auch wenn diese Frage hier nicht eindeutig geklärt wurde, so deutet die Ähnlichkeit der HupB/HupN-Proteine mit den HupA/HupB-Proteinen aus *E. coli* doch auf Heterodimer-Bildung auch in *Pseudomonas* hin.

Wie Claret & Rouvière-Yaniv (1997) beschrieben, ändert sich die Zusammensetzung von HU in *E. coli* im Laufe der Wachstumskurve. In der frühen exponentiellen Phase besteht HU überwiegend aus dem HupA-Homodimer und zu einem geringeren Teil aus dem HupA/B-Heterodimer. In der Mitte des exponentiellen Wachstums enthalten die Zellen gleich viel HupA-Homodimer und HupA/B-Heterodimer, während HU in der stationären Phase hauptsächlich als Heterodimer und in nur kleinen Mengen als HupA- und HupB-Homodimer auftritt. Im Fall von *P. putida* KT2442 ergab Aufreinigung des nativen HU-Proteins und anschließende N-terminale Sequenzierung eine Zusammensetzung von HupB und HupN im Verhältnis 2:1. Unter der Annahme, daß HupB und HupN der Pseudomonaden Heterodimere bilden können, könnte der Unterschied in der Konzentration beider Proteine dann einerseits auf entsprechende Konzentrationsverhältnisse an Hetero- und Homodimeren zurückzuführen sein, wobei z. B. entweder das HupB-Homodimer gegenüber dem HupB/HupN-Heterodimer überwiegt oder gleiche Mengen an HupB-Homodimeren und HupB/HupN-Heterodimeren vorhanden wären. Andererseits könnten die unterschiedlichen Mengen an HupB und HupN aber natürlich auch einfach unterschiedliche intrazelluläre Konzentrationen zweier verschiedener HupB- bzw. HupN-Homodimere widerspiegeln.

Im Falle von *P. aeruginosa* war in vorangegangenen Arbeiten der N-Terminus des HU-Proteins bestimmt und aufgrund einer einzelnen zu HupB aus *E. coli* homologen Sequenz vermutet worden, daß HU in diesem Organismus ein HupB-Homodimer ist (Hawkins & Wootton, 1981; Toussaint *et al.*, 1993). Die Ergebnisse dieser Arbeit aber, daß nämlich in *P. aeruginosa* wie in *P. putida* neben dem *hupB*-Gen noch ein *hupN*-Gen existiert und in *P. putida* jedenfalls die Konzentration von HupN geringer als die von HupB war, könnte bedeuten, daß in den früheren Arbeiten die ebenfalls vorhandene HupN-Sequenz, da von HupB überlagert, lediglich nicht detektiert werden konnte.

Funktionalität der *hupB*- und *hupN*-Genprodukte

Um zu zeigen, daß die in *P. putida* gefundenen Gene *hupB* und *hupN* für funktionale HU-Proteine codieren, wurde ein entsprechender Komplementationstest durchgeführt (s. 3.1.7). Hierbei zeigte sich, daß sowohl *hupB* als auch *hupN* in der Lage sind, ein mutiertes *hbs*-Gen in *B. subtilis* gänzlich zu komplementieren. Beide HU-Proteine aus *P. putida* besitzen somit die Fähigkeit, wie das Wildtyp-Protein HBSu in *B. subtilis* als ein typisches HU-Protein, die DNA-Reparatur zu stimulieren.

Um den Effekt von HupB und HupN auf Promotor-Aktivierung bzw. Transkriptionsraten zu analysieren, wurden Deletionsmutanten von *P. putida* KT2442 erzeugt, um hier dann die Transkription ausgehend vom Ps1-Promotor *in vivo* zu bestimmen (s. 3.1.8). Verwendet wurde ein Stamm, welcher eine chromosomale Ps::lacZ Promotor-Fusion besitzt, die somit in Monocopy vorliegt, wodurch Gendosiseffekte ausgeschlossen werden. In der *hupN*-Deletionsmutante konnte kein signifikanter Einfluß auf die Ps1-Aktivität gemessen werden, während in der *hupB*-Deletionsmutante die Ps1-Aktivität um 30 % geringer war als im Wildtyp. Diese Ergebnisse zeigen, daß in der Ps-Promotorregion das HupB-Homodimer höhere DNA-bindende und/oder DNA-flexibilisierende Aktivität besitzt als das HupN-Homodimer. Diese Schlußfolgerung gilt nur, wenn man annimmt, daß in *P. putida* durch das Fehlen eines Hup-Proteins, die Expression des jeweils anderen *nicht* signifikant beeinflusst wird bzw. daß die Konzentration der Hup-Monomere in den beiden Deletionsmutanten jeweils gleich hoch ist. Dies ist wahrscheinlich, da in *E. coli* die Abwesenheit einer HU-Untereinheit kaum die Transkriptionsrate des Gens der anderen HU-Untereinheit beeinträchtigt (Bonnefoy *et al.*, 1989), auch wenn ein schwacher Autoregulationseffekt von HU in *E. coli* auf die Expression der eigenen codierenden Gene beschrieben wurde (Kohno *et al.*, 1990; Kohno *et al.*, 1994). Allerdings könnten außer unterschiedlichen Syntheseraten auch andere Effekte zu veränderten intrazellulären HupB- bzw. HupN-Konzentrationen führen. So beschrieben Bonnefoy *et al.* (1989), daß in einer *E. coli* *hupA*-Mutante die Konzentration des HupB-Monomers deutlich geringer ist als im Wildtyp, da sie, in Abwesenheit von HupA, durch die Lon-Protease abgebaut wird. Bezüglich der Expression der *hup*-Gene von *E. coli* konnte nachgewiesen werden, daß sie durch die Proteine CRP (cAMP Receptor Protein) und FIS (Factor for Inversion Stimulation) reguliert wird (Claret & Rouvière-Yaniv, 1996). Die Frage, ob die Expression von *hupB* und *hupN* in *P. putida* ähnlichen Regulationsmechanismen unterworfen ist wie bei *hupA* und *hupB* in *E. coli*, kann erst durch weitere Arbeiten beantwortet werden.

Im Vergleich zu den *hupB*- bzw. *hupN*-Deletionsmutanten von *P. putida* besaß eine *hupAB*-Doppelmutante von *E. coli* eine um 60 % geringere Ps1-Aktivität als der Wildtyp (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). Da die Konstruktion einer *hupBN*-Doppelmutante von *P. putida* nicht gelang und offenbar auch nicht möglich ist (s. u.), bleibt die Frage, ob wie in

der *E. coli* *hupAB*-Mutante auch in einer solchen *P. putida*-Doppelmutante die Ps1-Aktivität noch deutlich geringer wäre als in der *hupB*-Deletionsmutante. Insgesamt zeigten die konstruierten *hupB*- bzw. *hupN*-Deletionsmutanten von *P. putida* die gleichen Wachstumscharakteristika (Teilungsrate, Kolonieform, UV-Sensitivität; Ergebnisse wurden nicht gezeigt) wie der Wildtyp, was in Übereinstimmung mit den Literaturdaten für *E. coli* ist (Huisman *et al.*, 1989; Wada *et al.*, 1988).

***P. putida hupBN*-Deletionsmutanten sind letal**

Zur Konstruktion einer *hupBN*-Doppeldeletionsmutante von *P. putida* wurde in einer *hupB*-Deletionsmutante, die ein *hupB*-Expressionsplasmid enthielt, eine zusätzliche Deletion auch im *hupN*-Gen erzeugt (s. 3.1.8). Alle Versuche, aus diesen chromosomalen *hupBN*-Doppelmutanten das HupB-produzierende Plasmid zu entfernen und so eine plasmidfreie Doppelmutante zu erhalten, scheiterten, wohingegen die einfache *hupB*-Mutante leicht vom Plasmid kuriert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine *hupBN*-Doppelmutante nicht lebensfähig ist. Allerdings besteht theoretisch auch die Möglichkeit, daß die erworbenen Funktionsdefizite der Doppelmutante den Verlust des Plasmids verhindern. Bei *E. coli* ist die Konstruktion einer *hupAB*-Doppelmutante zwar möglich, jedoch besitzt sie im Vergleich zu den einfachen Mutanten einen veränderten Phänotyp (Huisman *et al.*, 1989; Wada *et al.*, 1988). Bei Huisman *et al.* (1989) wurde zudem beschrieben, daß *E. coli hupAB*-Doppelmutanten zu Anfang extrem empfindlich waren, jedoch bei weiterer Kultivierung zunehmend lebensfähiger wurden. Weiterhin beobachteten die Autoren, daß die Anzahl lebender Zellen in Kolonien der Doppelmutante anfangs 100fach geringer war als in Kolonien des Wildtyps. Daher vermuteten sie, daß HU-negative Stämme von *E. coli* kompensatorische, sekundäre Mutationen akkumulieren, die das Wachstum wieder begünstigen. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß auch *E. coli*-Stämme noch lebensfähig sind, die nicht nur Mutationen in beiden HU-Genen, sondern zusätzlich auch in den IHF-Genen tragen (Mendelson *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu scheinen *hupBN*-Doppelmutanten von *P. putida* nicht in der Lage zu sein, sekundäre Mutationen zu erwerben, die den Verlust von HU kompensieren würden. Ein ähnliches Beispiel für eine solch essentielle Funktion von HU ist das HBSu-Protein von *B. subtilis* (Micka & Marahiel, 1992).

Biochemische Charakterisierung des *P. putida* HU-Proteins

Für die weitere Charakterisierung von HupB und HupN wurden die Proteine aus überexprimierenden *P. putida*-Stämmen aufgereinigt (s. 3.2). Hierzu wurden jeweils das *hupB*- bzw. *hupN*-Gen in einen „broad host range“-Expressionsvektor kloniert und die entstandenen Plasmide wurden in *P. putida* KT2442 (zur Expression von *hupN*) bzw. *P. putida* KT2442 Ps::*lacZ* Δ *hupN* (zur Expression von *hupB*) transferiert. Die Expression der HU-Gene erfolgte in diesen Stämmen, um eine Kontamination der aufgereinigten HU-Proteine mit den homologen Proteinen anderer Wirtsorganismen, wie z. B. *E. coli*, zu

vermeiden. Zudem wurde *hupB* in der *hupN*-Deletionsmutante exprimiert, weil die Expression dieses Gens im Vergleich zu *hupN* gering war, wodurch anderenfalls die Menge an begleitendem HupN in der HupB-Präparation zu hoch gewesen wäre.

Da HU-Proteine generell nur als Dimere aktiv sind (Drlica & Rouvière-Yaniv, 1987), wurde beim gereinigten HupB und HupN die Fähigkeit zur Dimerisierung getestet. Nachdem die Proteine jeweils mit einem Crosslinker behandelt worden waren, konnten in beiden Fällen Dimere eindeutig nachgewiesen werden, bzw. die Proteine lagen überwiegend als Dimere vor. Darüber hinaus konnten bei HupN sogar zusätzlich Tri- und Tetramere beobachtet werden, wobei offenbar mehr Tetramere als Trimere gebildet wurden (Abb. 3.19). Die Bildung von Tri- und Tetrameren könnte auf eine zu hohe Konzentration von HupN im Ansatz zurückzuführen sein. Das Gleiche sollte auch für HupB gelten, obwohl hier keine Tri- oder Tetramere zu sehen sind, möglicherweise nur daher, weil sich HupB vergleichsweise schlecht mit Coomassie-Brilliant Blau R250 anfärben läßt (trotz gleicher Konzentrationen an HupB und HupN sind die Signalstärken der Proteinbanden unterschiedlich, s. Abb. 3.19). Die Bildung von Multimeren bei hohen Konzentrationen der Monomere war auch bei der (üblicherweise nicht multimerisierenden) Negativkontrolle Lysozym zu beobachten.

Rouvière-Yaniv & Kjeldgaard (1979) zeigten für *E. coli* HU, daß das α 2-Homodimer und das $\alpha\beta$ -Heterodimer nach dem Crosslinken hauptsächlich Dimere und in Spuren auch Tri- und Tetramere bildet. Bei dem β 2-Homodimer hingegen wurde eine verstärkte Bildung von Tri- und Tetrameren beobachtet. Eine vermehrte Bildung von Oligomeren beim Crosslinking in Anwesenheit von DNA wurde für das zu HU homologe Protein HlpA aus der Alge *Chrytomonas* Φ beschrieben (Grasser *et al.*, 1997). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit für die *Pseudomonas*-Proteine HupB und HupN in diesem Maße nicht bestätigt werden und ebenso nicht für HU aus *E. coli* (Grasser *et al.*, 1997).

Mit Crosslinker behandeltes HupN bildete auf dem Gel keine eindeutige Bande, sondern eher eine Doppelbande bzw. einen Schmier (s. Abb. 3.19). Dieses Phänomen ist häufig bei Crosslink-Experimenten zu beobachten (pers. Mitteilung J. Pérez-Martín, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, Spanien) und beruht wahrscheinlich auf der Bildung von verschiedenen Sekundärstrukturen mit unterschiedlichen Laufeigenschaften. Ähnliche Doppelbanden traten ebenfalls beim Crosslinking von HU aus *E. coli* und dem HU-ähnlichen HlpA-Protein aus dem Plastid der Alge *Chrytomonas* Φ auf (Grasser *et al.*, 1997).

Um die isolierten *P. putida*-Proteine HupB und HupN jeweils in ihrer DNA-bindenden bzw. DNA-biegenden Aktivität näher zu untersuchen, wurden β -Protein-abhängige *in vitro*-Rekombinationstests durchgeführt (s. 3.2.4). Beim Vergleich der *in vitro*-Aktivität von HupB und HupN zeigte sich ein deutlicher Unterschied: während im β -Rekombinationstest mit HupB ab einer Konzentration von 150 nM schlagartig ca. 100 % Rekombination erreicht wurde, stieg sie mit HupN ab 75 nM langsam an, um dann ebenfalls bei 150 nM ca. 100% Rekombination zu erreichen. Dieses Ergebnis deutet auf eine unterschiedliche DNA-

Bindungsaktivität hin. Im Vergleich dazu zeigten die HU α - und HU β -Homodimere von *E. coli* ein ähnliches Verhalten (Alonso *et al.*, 1995). Hierbei stimulierte *E. coli*-HU α die β -Rekombination erst ab einer Konzentration von 200 nM, während HU β diese Aktivität schon ab 50 nM zeigte. Bei den von Alonso *et al.* (1995) untersuchten *E. coli* HU-Homodimeren konnte ein besonderer Unterschied in der Kinetik der β -Rekombination, z. B. langsames oder schnelles Ansteigen der Aktivität wie bei HupB und HupN, nicht beobachtet werden. Weiterhin hatte aus HU α und HU β rekonstituiertes HU eine mittlere Aktivität. Diese würde sich möglicherweise ebenfalls ergeben, wenn HU aus *E. coli* keine Heterodimere bilden würde und eine 1:1-Mischung aus HU α und HU β eingesetzt worden wäre.

4.3 IHF aus *P. putida*

Aufreinigung von *P. putida* IHF

IHF ist ein weiteres Histon-ähnliches Protein, das eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Pu-Promotors spielt (De Lorenzo *et al.*, 1991). Um für die geplanten *in vitro*-Transkriptionsexperimente IHF aus *P. putida* zu erhalten, wurde zur Aufreinigung dieses Proteins ein *E. coli*-Produktionsstamm hergestellt, der die beiden *P. putida*-Gene für die IHF-Untereinheiten überexprimiert. Bei der Konstruktion des IHF-Expressionsplasmids mit den *P. putida*-Genen *ihfA* und *ihfB* wurde festgestellt, daß *ihfA* im Vergleich zu *ihfB* nur sehr gering exprimiert wurde. Hierbei erwies es sich als hilfreich, daß die Überexpression von *ihfB* allein zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten führt, was in Übereinstimmung mit den Eigenschaften von *ihfB* von *E. coli* ist (Nash *et al.*, 1987). Der Grund für die geringe Expression von *ihfA* liegt offenbar nicht an einer unterschiedlichen Codon-Nutzung (d. h. unterschiedliche Translationsraten) zwischen *E. coli* und *P. putida*, da einerseits im *ihfA*-Gen von *P. putida* keine besonderen, in *E. coli* seltenen Codons vorkommen und es andererseits auch möglich war, durch die Verdopplung der *ihfA*-Kopien deutlich verstärkte IhfA-Synthese zu erreichen. Für die IHF-Überexpression wurde schließlich ein Plasmid konstruiert, das zwei Kopien des *ihfA*-Gens sowie eine Kopie des *ihfB*-Gens, jeweils kontrolliert von einem starken P_{T7}-Promotor, enthält. Ein ähnliches Konstrukt wurde übrigens auch für die Überexpression von *E. coli*-IHF verwendet, das in dieser Form eher zufällig durch Selektion von *ihfA*⁺-Transformanten erhalten wurde (Nash *et al.*, 1987). Auch in diesem Fall waren möglicherweise die Genprodukte von mindestens zwei *ihfA*-Kopien notwendig, um zusammen mit dem Produkt eines *ihfB*-Gens ausreichend heterodimeres IHF zu bilden. Das Expressionsplasmid für *P. putida*-IHF wurde schließlich in einen speziellen *E. coli*-IHF⁻-Stamm transferiert, um eine Kontamination des *P. putida*-IHF mit wirtseigenem *E. coli* IHF-Protein zu vermeiden. Das aufgereinigte IHF setzte sich aus IhfA und IhfB im Verhältnis 1:2 zusammen, was bedeutet, daß trotz der doppelten Kopienzahl von *ihfA* nur halb soviel IhfA im *E. coli*-Produktionsstamm synthetisiert worden war wie IhfB. Geringe Expressionsraten

von *ihfA* beobachteten bereits Calb *et al.* (1996) bei der Klonierung der IHF-Gene von *P. putida*. Die Autoren beobachteten, daß *P. putida-ihfA* einen *E. coli-IhfA*⁻-Stamm weniger effektiv komplementierte als *ihfA* von *E. coli* und führten dies u.a. auf eine geringe Expression des *ihfA*-Gens von *P. putida* zurück.

Zur Aufreinigung von IHF aus überexprimierenden Zellen von *E. coli* BL21 (DE3) JW186 (pFBT15) wurde Heparin-Sepharose in einer Säulenchromatographie verwendet. Diese führte zur selektiven Anreicherung von IHF in sehr hoher Reinheit, da dieses Protein nur bei relativ hohen Salzkonzentrationen (1,0 – 1,3 M NaCl) von der Säule eluiert. Eine Kontamination der IHF-Präparation beispielsweise mit dem biochemisch sehr ähnlichen HU-Protein konnte nicht auftreten, weil es bereits bei weit geringerer NaCl-Konzentration eluiert (s. 3.2.2; Vorgias & Wilson, 1991).

Biochemische Charakterisierung und Funktionalität des *P. putida* IHF-Proteins

Das aufgereinigte IHF-Protein zeigte im β -Rekombinationstest eine ähnliche Aktivität wie IHF aus *E. coli*: während *P. putida*-IHF ab einer Konzentration von 400 nM vollständige Rekombination bewirkte, war bei *E. coli*-IHF eine Rekombination ab 360 nM zu beobachten, die aber bei dieser Konzentration noch keine 100 % erreichte (Alonso *et al.*, 1995). Trotz dieser ähnlichen Aktivität scheint IHF aus *P. putida* im Pu-Promotorbereich des *xyl*-Upper-Pathway Operons aus *P. putida* mit geringerer Affinität zu binden als das heterologe *E. coli*-IHF. Bei der Gel-Retentionsanalyse unter Verwendung eines Reaktionspuffers mit relativ hoher Salz- und geringer Glycerinkonzentration zeigte sich eine sehr schwache Bindung von *P. putida*-IHF an ein Pu-Promotorfragment. Im Vergleich dazu hatte *E. coli*-IHF im selben Experiment die gesamte freie DNA komplexiert, was die hohe Bindungsaffinität dieses Proteins für den Pu-Promotorbereich widerspiegelt. In einer zweiten Gel-Retentionsanalyse, bei der ein Reaktionspuffer mit geringer Salz- und höherer Glycerinkonzentration (10 % (v/v)) verwendet wurde, konnte mit *P. putida*-IHF eine gute Bindung an die Pu-Promotorregion nachgewiesen werden. Daß die Salzkonzentration die Bindung von Histon-ähnlichen Proteinen an DNA beeinflusst, wurde von Pinson *et al.* (1999) für HU gezeigt. Zudem ist eine Glycerinkonzentration von 10 % in einem Gel-Retardationsexperiment nicht besonders hoch und wurde auch bei der Untersuchung der Bindung von *E. coli*-IHF an die Promotoren Pu und PsI verwendet (De Lorenzo *et al.*, 1991; Holtel *et al.*, 1992). Der Effekt von Glycerin besteht darin, daß es die Bindungspartner näher zueinander bringt und auf diese Weise das Bindungsverhalten positiv beeinflusst.

Eine unterschiedliche Affinität der IHF-Proteine aus *P. putida* und *E. coli* für den Pu-Promotorbereich könnte sich dadurch erklären, daß die Basensequenz der IHF-Bindungsstelle für *P. putida*-IHF weniger optimal ist. Beispielsweise besitzt *E. coli*-IHF zu verschiedenen Bindungsstellen im *E. coli*-Genom sehr unterschiedliche Affinitäten, welche von $K_d=1$ nM bis $K_d=250$ nM reichen können (Freundlich *et al.*, 1992). Wie auch in *E. coli* (Goodrich *et al.*, 1990) so existiert in *P. putida* wahrscheinlich eine Vielzahl von leicht abgewandelten IHF-

Bindungssequenzen, die sich zu einer Consensus-Sequenz zusammenfassen lassen, welche aber möglicherweise etwas von der Consensus-Sequenz für *E. coli*-IHF abweicht. Die Unterschiede in der Aminosäuresequenz von IHF aus *P. putida* und *E. coli* sind zum größten Teil konservierte Austausche, jedoch unterscheidet sich der C-Terminus von IhfB aus *P. putida* erheblich von dem von *E. coli*, zudem ist er um sechs AS länger als der des *E. coli*-IhfB (Calb *et al.*, 1996). Ob diese Unterschiede für die verschiedene Affinität der IHF-Proteine für die Bindungsstelle in Pu verantwortlich sind, kann mit den bisherigen Daten nicht beantwortet werden. Die Bestimmung der Kristallstruktur von DNA-gebundenem *E. coli*-IHF zeigte allerdings, daß der N-Terminus beider Polypeptidketten mit der DNA Wasserstoffbrücken bildet und somit wohl primär die N-terminale Region der IHF-Polypeptide an der DNA-Bindung beteiligt ist (Rice *et al.*, 1996). Im Fall des *algD*-Promotors von *P. aeruginosa*, welcher zwei IHF-Bindungsstellen enthält, wurden Bindungsstudien sowohl mit *E. coli*-IHF als auch mit *P. aeruginosa*-IHF durchgeführt (Wozniak, 1994; Delic-Attree *et al.*, 1996). Die mit beiden IHF-Proteinen bestimmten Affinitäten unterschieden sich kaum voneinander und betrugen mit *P. aeruginosa*-IHF 2 μM (K_d für IHF-Bindungsstelle 1) sowie 130 nM (K_d für IHF-Bindungsstelle 2).

In diesem Zusammenhang kann nun auch die Frage gestellt werden, wo und mit welcher Affinität *P. putida*-IHF im Bereich der TOL-Promotoren Pr und Ps bindet, da alle Experimente hierzu nur mit *E. coli*-IHF durchgeführt wurden (Holtel *et al.*, 1995). In diesem Abschnitt befinden sich zwei Consensus-Bindungssequenzen für *E. coli*-IHF, von denen aber nur eine von *E. coli*-IHF tatsächlich gebunden wird (Holtel *et al.*, 1995). Weiterhin konnte in dieser Region eine zusätzliche IHF-Bindungsstelle identifiziert werden, die von *E. coli*-IHF gebunden wird, aber nicht sehr gut der IHF-Consensus-Sequenz entspricht. Dies belegt, daß die Affinität, mit der IHF an eine bestimmte Sequenz bindet, nicht unbedingt vorausgesagt werden kann. Weiterhin könnten die Widersprüche in der Literatur über eine Beteiligung von IHF an der Regulation der Aktivierung von Ps1 (Gomada *et al.*, 1994; Holtel *et al.*, 1995; Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a; Marqués *et al.*, 1998) auf eine möglicherweise unterschiedliche Affinität der IHF-Proteine aus *P. putida* und *E. coli* für die Bindungsstellen in der Pr-Ps-Promotorregion zurückzuführen sein.

4.4 σ^{54} -RNA-Polymerase aus *P. putida*

Die RNA-Polymerase (RNAP) liegt in der Zelle als eine Mischung aus Core-Enzym plus verschiedener Sigma-Faktoren vor, wobei die σ^{70} -RNAP den größten Teil bildet. Um reine σ^{54} -RNAP zu erhalten wie zur Aktivierung der Promotoren Pu und Ps1 *in vitro* erforderlich, wurde eine Strategie gewählt, bei der zunächst das native RNAP-Core-Enzym aufgereinigt und anschließend mit gereinigtem, rekombinatem σ^{54} zum σ^{54} -RNAP-Holoenzym rekonstituiert wurde. Auf diese Weise wurde bereits die σ^{54} -RNAP von *E. coli* erfolgreich

hergestellt (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1996a).

Die Aufreinigung des RNAP-Core-Enzyms war insofern kritisch, als es in der SDS-PAGE absolut keine sichtbaren Spuren an Sigma-Faktoren enthalten sollte. Da nur die σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 untersucht werden sollten, hätten weitere Sigma-Faktoren als nur σ^{54} in der rekonstituierten RNAP keine eindeutigen Ergebnisse geliefert, weil beispielsweise Transkription von Ps2 σ^{70} -RNAP erfordert. An dieser Bedingung scheiterten Vorversuche, bei denen nach der Heparin-Sepharose-Chromatographie alle RNAP-enthaltenden Fraktionen vereinigt wurden, da nach der zweifachen Durchführung der verlustreichen Phosphocellulose-Chromatographie zwar reines, aber in nur geringen Mengen gewonnenes Core-Enzym erhalten wurde (s. 3.5). Die Möglichkeit, bereits nach der Heparin-Säule nur die Fraktionen mit hauptsächlich dem Core-Enzym weiter zu verwenden, erforderte schließlich nur einmal die Durchführung der Phosphocellulose-Chromatographie, bei der die noch verbliebenen Spuren an Sigma-Faktor vom Core-Enzym getrennt wurden. Die in Abb. 3.28 dargestellt Trennung der Fraktionen aus der Heparin-Chromatographie in Core-Enzym- und Holoenzym-enthaltende war nur möglich bzw. sichtbar durch eine Säulenchromatographie mit hoher Trennleistung in Kombination mit einer sehr gut auflösenden SDS-PAGE. Das zur Aufreinigung des RNAP-Core-Enzyms verwendete Protokoll ist somit zusammengefügt aus den Protokollen von Fujita & Amemura (1992) und Wellington & Spiegelman (1991). Die Aufreinigung des Core-Enzyms nach den bisher beschriebenen Methoden von Burgess & Jendrisak (1975), Allan & Kropinski (1987) sowie Fujita & Amemura (1992) allein war bei *P. putida* KT2442 nicht erfolgreich.

Da die intrazelluläre Konzentration an σ^{54} im Vergleich zu σ^{70} gering ist (Helmann & Chamberlin, 1988) wurde das Gen für σ^{54} (*rpoN*) aus *P. putida* in einem *E. coli rpoN*-Stamm überexprimiert. Die Überexpression von σ^{54} -Genen führt allerdings generell zur Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten, so daß nur ein kleiner Teil des σ^{54} in Lösung verbleibt (Wang *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 1996). Um größere Mengen an σ^{54} zu erhalten, wurde das Aufreinigungsprotokoll von Cannon *et al.* (1996) verwendet, in dem σ^{54} zunächst in Form von unlöslichen „inclusion bodies“ isoliert wurde. Anschließend wurde das Protein mit 8,0 M Harnstoff denaturiert und durch Dialyse gegen Puffer renaturiert. Im darauffolgenden Schritt, einer Chromatographie mit Heparin-Sepharose, wurde aktives bzw. korrekt gefaltetes σ^{54} von inaktivem Protein getrennt. Bei diesem Schritt wird deshalb aktives σ^{54} selektiv angereichert, weil nur korrekt gefaltetes Protein in der Lage ist, DNA bzw. Heparin zu binden (Cannon *et al.*, 1996).

Das Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung der σ^{54} -Präparation zeigte, daß das Protein in mindestens drei Varianten vorlag, die sich durch das Fehlen ein oder mehrerer N-terminaler AS unterschieden. Dies liefert einen Hinweis darauf, daß σ^{54} möglicherweise in besonderer Art posttranslational prozessiert wird. Eine Rolle hierbei spielt offenbar die FtsH-Protease, die, gebunden an der inneren Membran gramnegativer Bakterien, u. a. die

Konzentration des Hitzeschock-Faktors σ^{32} (Tomoyasu *et al.*, 1995) und von σ^{54} (Carmona & de Lorenzo, 1999) reguliert. Daß FtsH die Aktivität von σ^{54} und damit indirekt auch die Aktivierung des Pu-Promotors reguliert, wurde von Carmona & de Lorenzo (1999) gezeigt. Die Autoren konnten nachweisen, daß FtsH⁻-Zellen von *E. coli* zwar normale Mengen an σ^{54} exprimieren, sich aber Verhalten, als ob σ^{54} inaktiv wäre. Dieser Effekt konnte allerdings durch Überexpression von σ^{54} wieder aufgehoben werden. Der genaue Mechanismus der Regulation der Aktivität von σ^{54} durch FtsH ist noch nicht bekannt.

4.5 Analyse der Pu- und Ps1-Promotoraktivitäten in *in vitro*-Transkriptionsversuchen mit Proteinkomponenten aus *P. putida*

4.5.1 Die Promotoren Pu und Ps1 können jeweils durch HupB oder HupN aktiviert werden

Die in der vorliegenden Arbeit isolierten und charakterisierten Histon-ähnlichen Proteine HU und IHF aus *P. putida* wurden in dem lediglich aus *P. putida*-Komponenten konstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem eingesetzt, um ihre spezifische Rolle bei der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 unter vollständig definierten Bedingungen zu untersuchen. Der Vorteil dieses reinen *P. putida*-Transkriptionssystems bestand darin, daß die relevanten Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Wechselwirkungen denen des natürlichen Wirts des *P. putida*-TOL-Plasmids, auf dem ja Pu und Ps1 lokalisiert sind, entsprechen sollten.

Die *P. putida*-HU-Proteine HupB und HupN wurden zunächst separat auf ihre Fähigkeit hin getestet, als Homodimere die Aktivierung von Pu bzw. Ps1 zu stimulieren. Für beide Proteine konnte nachgewiesen werden, daß sie die Transkriptionsraten sowohl von Pu wie auch von Ps1 verstärken (s. Abb. 3.30 und 3.34). Im Fall von Ps1 wurde im heterologen *E. coli*-System der positive Einfluß von *E. coli*-HU auf die Aktivierung dieses Promotors *in vivo* bereits nachgewiesen (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a). In der vorliegenden Arbeit konnte dies für beide HU-Proteine aus *P. putida in vitro* bestätigt werden. Weiterhin war zwar bereits in früheren Arbeiten die Aktivierung des Pu-Promotors durch HU *in vitro* gezeigt worden, allerdings nur mit *E. coli*-Komponenten (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1997a; Carmona *et al.*, 1999). Da diese Ergebnisse mit dem heterologen *E. coli*-System in dieser Arbeit im reinen *P. putida*-Transkriptionssystem bestätigt werden konnten, ist davon auszugehen, daß HU auch in nativen *P. putida*-Zellen dieses Potential zur Aktivierung von Pu besitzt. Daß HU somit, wenn auch mit geringerer Effizienz, IHF bei der Aktivierung von Pu ersetzen kann, liegt an der Eigenschaft von HU, generell wirksam an DNA zu binden und in der Kontaktregion die Flexibilität bzw. Biegsamkeit zu erhöhen. Hierbei werden bereits durch die DNA-Sequenz

vorgegebene Knicke durch die HU-Bindung stabilisiert und verstärkt. Ganz anders dagegen verhält sich IHF, welches DNA nur spezifisch an bestimmten Sequenzmotiven bindet und so die Bildung einer DNA-Schleife in die durch die Bindungsstelle vorgegebene Richtung bewirkt. Im Pu-Promotor wird so ein leichter, Sequenz-determinierter Knick in der DNA-Region zwischen den UAS (den XylR-Bindungsstellen) und der -24/-12-Sequenz (der σ^{54} -RNAP-Bindungsstelle) durch die Bindung von HU verstärkt. Dadurch wird der zur Promotor-Aktivierung notwendige Kontakt zwischen der σ^{54} -RNAP, gebunden an der -24/-12-Region, und XylR, gebunden an den UAS, ermöglicht (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1997a). Die Bindung von IHF an seine spezifische Bindungsstelle bewirkt dagegen eine viel effektivere Krümmung der DNA in eine bestimmte Richtung, die zu einem gezielteren Kontakt zwischen XylR und σ^{54} -RNAP führt.

Die mit dem *P. putida*-Transkriptionssystem erhaltenen Daten zeigen weiterhin, daß HupN bei beiden Promotoren (Pu und Ps1) effektiver ist als HupB. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten aus dem β -Rekombinationstest (s. Abb. 3.20) überein, da hier HupN auch bereits bei geringerer Konzentration als HupB Rekombination ermöglichte. Dagegen deuten die Ergebnisse zur Untersuchung der Ps1-Promotoraktivität in den jeweiligen *hupB*- bzw. *hupN*-Deletionsmutanten eher auf HupB als auf HupN als die aktivere Komponente: die in der $\Delta hupB$ -Mutante gemessene Ps1-Aktivität ist deutlich geringer als im Wildtyp, während die $\Delta hupN$ -Mutante hier keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp aufwies. Der Grund für dieses unterschiedliche Verhalten *in vivo* und *in vitro* könnte zum einen darin liegen, daß die *hupB*-Mutation nur indirekt, nämlich möglicherweise über eine Beeinträchtigung der Expression von *hupN* die Ps1-Promotor-Aktivität negativ beeinflusst, daß also tatsächlich doch HupN die für die Ps1-Aktivität direkt relevante Komponente darstellt. Einen gegenseitigen Einfluß von HupA bzw. HupB auf die Expression des jeweils anderen codierenden Gens wurde für HU aus *E. coli* zwar beschrieben (Kohno *et al.*, 1990, 1994), jedoch war der Effekt nicht sehr groß. Zum anderen könnte die geringe Ps1-Aktivität in der $\Delta hupB$ -Mutante – ebenfalls als indirekter Effekt – auf eine stärkere Repression des Ps1-Promotors durch IHF zurückzuführen sein: daß IHF die Ps1-Promotoraktivität negativ beeinflussen kann, wurde bereits gezeigt (Holtel *et al.*, 1995; Marqués *et al.*, 1998). Da die HupB- und HupN-Homodimere unterschiedliche DNA-bindende Aktivitäten aufweisen (s. 4.1 bzw. Abb. 3.20) und auch möglicherweise unterschiedliche DNA-Motive oder Strukturen erkennen, wobei sie möglicherweise mit dem ebenfalls DNA-bindenden IHF konkurrieren, könnte durch das Fehlen von HupB in der $\Delta hupB$ -Mutante die Bindung von IHF an seine spezifischen Stellen begünstigt werden.

4.5.2 *In vitro* wird Ps1 durch IHF nicht reprimiert

Um den in der Literatur umstrittenen Aspekt der Ps1-Repression durch IHF zu untersuchen, wurde ermittelt, ob sich *in vitro* bei konstanter HU (HupB/HupN)-Konzentration eine

ansteigende IHF-Konzentration negativ auf die Ps1-Promotoraktivität auswirkt (s. Abb. 3.32). Dabei wurde im Bereich von 100 bis 300 nM IHF und in Anwesenheit von 200 nM HupB/HupN keine Abnahme der Transkription durch Ps1 festgestellt. Dieses Ergebnis bestätigt die von Pérez-Martín & de Lorenzo (1995a) beschriebenen *in vivo*-Versuche, bei denen in *E. coli* kein Einfluß von IHF auf die Ps1-Aktivität festgestellt wurde. Nicht bestätigt werden konnten somit die *in vivo* Untersuchungen von Holtel *et al.* (1995) und Marqués *et al.* (1998), welche eine Repression von Ps1 durch IHF zeigten.

In dem *P. putida*-Transkriptionssystem kann IHF offenbar nicht an seine Bindungsstellen in der Pr-Ps-Promotorregion binden (und somit mit der Promotoraktivierung interferieren), wenn bereits HU (HupB/HupN) gebunden hat. Entweder konkurrieren IHF und HU um Bindungsstellen, in diesem Fall besitzt HupB/HupN wahrscheinlich eine höhere Affinität zur Pr-Ps-Region. Andererseits könnte die durch HU bewirkte DNA-Konformation im Ps1-Promotor eine verstärkte Bindung der σ^{54} -RNAP in der Weise zur Folge haben, wie es für Pu beschrieben wurde (Carmona *et al.*, 1999). In der Konsequenz wären die in der Pr-Ps-Region lokalisierten IHF-Bindungsstellen (Holtel *et al.*, 1995) durch σ^{54} -RNAP sowie XylR (XylR Δ A im Transkriptionssystem) besetzt, so daß IHF nicht binden kann.

Es wäre hierbei theoretisch denkbar, daß das Konzentrationsverhältnis von IHF und HU darüber entscheidet, welches der beiden Proteine in Ps binden kann und in der Folge die Promotoraktivität reprimiert bzw. aktiviert. Die intrazelluläre Konzentration von IHF und HU variiert in *E. coli* zwischen den einzelnen Wachstumsphasen. Nach Azam *et al.* (1999) ist die HU-Konzentration in der exponentiellen Phase am höchsten und nimmt dann im weiteren Verlauf wieder ab. Einen anderen Verlauf zeigt dagegen IHF, dessen Konzentration in der exponentiellen Phase am geringsten und in der frühen stationären Phase am höchsten ist. In Abb. 4.2 ist die intrazelluläre Konzentration von IHF und HU (als Angabe von Einzelmolekülen pro Zelle) in Abhängigkeit von der Wachstumsphase dargestellt. Allerdings ist die tatsächliche Verfügbarkeit an freiem IHF bzw. HU in der Zelle nicht ohne weiteres ermittelbar, da der größte Teil dieser Proteine bereits an DNA gebunden ist. Darüber hinaus gibt es noch weitere Faktoren, wie z. B. die Art des Nährmediums, welche die Expression der Histon-ähnlichen Proteine unterschiedlich beeinflussen (Azam *et al.*, 1999). Aufgrund der genannten Aspekte ist es durchaus vorstellbar, daß unter bestimmten Bedingungen und in bestimmten Wachstumsphasen die IHF-Konzentration höher ist als die von HU. In diesem Fall könnte IHF an die von HU nicht besetzte Pr-Ps-Promotorregion binden und dadurch wiederum die Bindung von σ^{54} -RNAP und XylR verhindern. Die in der Literatur beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse über das Vermögen von IHF, den Ps1-Promotor zu reprimieren (Holtel *et al.*, 1995; Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a; Marqués *et al.*, 1998), könnte somit auf einen unterschiedlichen metabolischen Status der untersuchten Zellen und somit unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationsverhältnissen von IHF bzw. HU in den jeweiligen Experimenten der verschiedenen Autoren zurückzuführen sein.

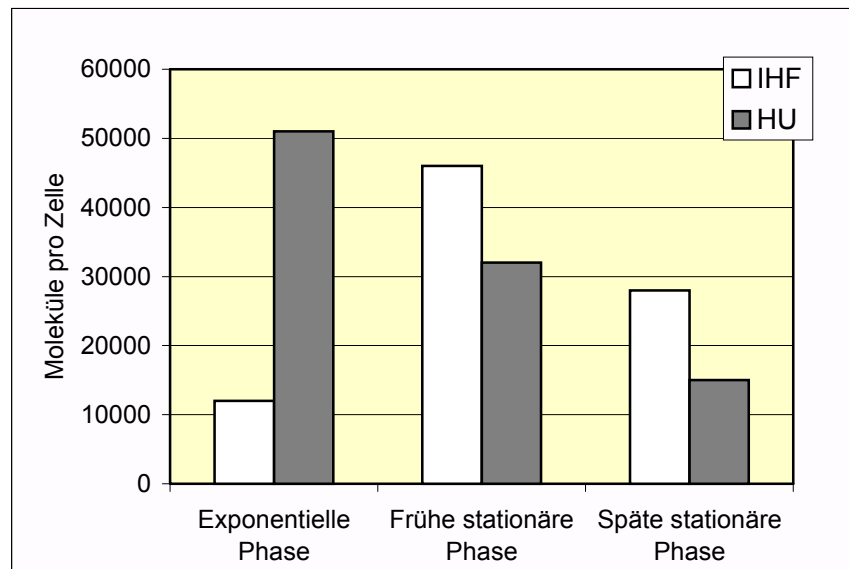


Abb. 4.2: Wachstumsphasen-abhängige Konzentrationsunterschiede von IHF und HU in *E. coli*. Die Daten sind aus Azam *et al.* (1999) entnommen.

Ein bereits untersuchtes Beispiel für eine solche, eventuell auch im Fall der *P. putida* Ps1-Promotor-Regulation zu postulierende, konzentrationsabhängige Modulation der Bindung von IHF an DNA ist der *E. coli*-Replikationsursprung *oriC*: hier entscheidet das Konzentrationsverhältnis zwischen HU und IHF darüber, ob IHF an *oriC* bindet oder nicht (Bonnefoy & Rouvière-Yaniv, 1992).

4.5.3 HupB und HupN bilden wahrscheinlich HupB/HupN-Heterodimere in *P. putida*

Die sich in der vorliegenden Arbeit als falsch erwiesene Annahme, daß innerhalb der Eubakterien nur die Gruppe der Enterobakterien heterodimeres HU besitzt (Oberto & Rouvière-Yaniv, 1996), ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß hier die *hupA*- und *hupB*-Gene hohe Homologie aufweisen, was die Detektion und Isolierung dieser Gene erleichterte. Die Anzahl von Organismen außerhalb der Enterobakterien, die genauer auf HU-Gene hin untersucht wurden, ist relativ klein. Dazu kommt, daß *H. influenzae*, dessen Genom vollständig sequenziert worden ist, tatsächlich offenbar nur ein einzelnes HU-Gen besitzt und daß im Fall von *P. aeruginosa* ein zweites HU-Gen (nämlich *hupN*) zunächst nicht detektiert werden konnte (s. 4.2). Die Eigenschaft der enterobakteriellen HupA- und HupB-Proteine $\alpha\beta$ -Dimere zu bilden, ist experimentell nur für *E. coli* gezeigt worden (Rouvière-Yaniv & Kjeldgaard, 1979). Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen den Vertretern der Gruppe

der Enterobakterien sind die Existenz von zwei HU-Genen und die Bildung von Heterodimeren als wahrscheinlich für die gesamte Gruppe anzunehmen. Ob allerdings in *P. putida* bzw. in *P. aeruginosa* HupB/HupN-Dimer-Bildung als wahrscheinlich anzunehmen ist, muß wegen der doch insgesamt geringen Homologie von HupN zu anderen HU-Proteinen zunächst offen bleiben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen insgesamt noch keine eindeutige Aussage darüber zu, ob HupB und HupN in *P. putida* tatsächlich Heterodimere formen (s. 4.2). Ein interessanter Hinweis auf Existenz und Funktionalität von HupB/HupN-Dimeren ist allerdings das Ergebnis des *in vitro*-Transkriptionstests (s. Abb. 3.30), in dem die Aktivierung von Ps1 mit einer Mischung aus HupB und HupN untersucht wurde: im Vergleich zu den Transkriptionsraten, die jeweils mit HupB und HupN allein erhalten wurden, war die Ps1-Aktivität mit der HupB/HupN-Mischung im Durchschnitt höher. Daß dieser Effekt einfach die Summe der Wirkungen darstellt, die durch die Bindung von jeweils HupB- und HupN-Homodimeren an unterschiedlichen Regionen hervorgerufen wird, ist zwar möglich, aber eher unwahrscheinlich, da dieses bisher noch nicht beschrieben wurde. Dieses im *in vitro*-Assay erhaltene Ergebnis deutet somit darauf hin, daß sich HupB/HupN-Heterodimere geformt haben, die die Aktivierung des Ps1-Promotors effektiver stimulieren als es in Gegenwart nur eines HU-Typs der Fall ist. Gestützt wird diese Aussage durch die geringere Ps1-Aktivität in der $\Delta hupB$ -Deletionsmutante. Die Frage, warum dann die Aktivität von Ps1 in der $\Delta hupN$ -Mutante nicht auch geringer ist, muß derzeit unbeantwortet bleiben (s. hierzu auch 4.5.1).

4.5.4 IHF und HU sind möglicherweise an der Aktivierung von Pu beteiligt

Anders als im Falle des Ps1-Promotors, der *in vitro* bei gleichzeitiger Anwesenheit von HupB/HupN und IHF keine signifikant anderen Aktivitäten zeigte als mit HupB/HupN allein, korrelierte im Fall des Pu-Promotors die *in vitro*-Transkriptionsaktivität mit der Höhe der IHF-Konzentration bis zu einem Sättigungspunkt, von wo aus eine weitere Erhöhung der IHF-Konzentration zu keiner wesentlichen Aktivitätszunahme mehr führte. Eine signifikante, weitere Zunahme der Pu-Aktivität konnte allerdings festgestellt werden, wenn zusätzlich zu IHF in Sättigungskonzentration noch HupB/HupN zugefügt wurde. Hierbei zeigte sich schon eine deutliche Aktivitätszunahme bei relativ geringer HupB/HupN-Konzentration. Offenbar wirken hier also die *P. putida*-Proteine IHF und HU (HupB/HupN) in kooperativer oder synergistischer Weise bei der Aktivierung von Pu. Daß auch HU allein im Prinzip in der Lage ist, den Pu-Promotor zu aktivieren, wurde in der vorliegenden Arbeit mit HupB/HupN aus *P. putida* sowie in anderen Arbeiten mit HU aus *E. coli* festgestellt (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a, 1997a; Carmona *et al.*, 1999). Ein positiver Effekt auf die Pu-Aktivierung mit HU und IHF zusammen wurde allerdings mit *E. coli*-Komponenten weder *in vivo* noch *in vitro* beobachtet: ein HU⁻-Stamm von *E. coli* zeigte keine veränderte Pu-Aktivität im Vergleich

zum Wildtyp (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a) und die gleichzeitige Anwesenheit von gereinigtem HU und IHF aus *E. coli* führte zu keiner Zunahme der Transkriptionsraten von Pu *in vitro* (Carmona *et al.*, 1999). Somit scheint der kooperative oder synergistische Effekt von IHF und HU im Pu-Promotor nur im Zusammenwirken dieser Proteine aus *P. putida* wirksam zu sein, was die Notwendigkeit der Etablierung eines reinen *P. putida*-Transkriptionssystems zur Detektion solcher Effekte unterstreicht.

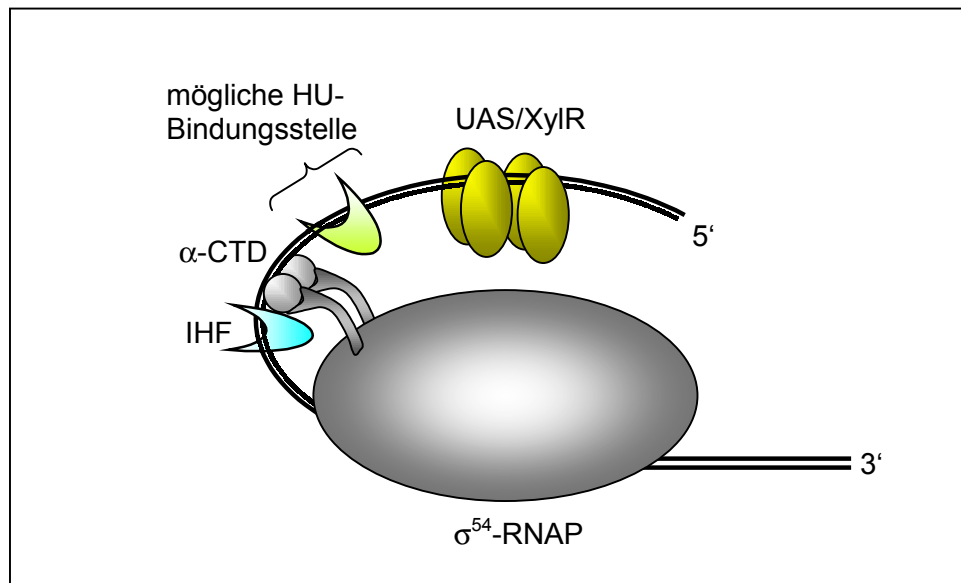


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der räumlichen Konfiguration bei der Aktivierung des Pu-Promotors, wie sie im Kapitel 4.5.4 vorgeschlagen wird. Als Grundlage diente das Model der Pu-Aktivierung aus Bertoni *et al.* (1998). Die Bindung von HU bzw. HupB/HupN wird in der Region zwischen der IHF-Bindungsstelle und der UAS (XylR-Bindungsstellen) vermutet.

Ein ähnlicher, kooperativer Effekt zwischen IHF und HU aus *E. coli* auf die DNA-Bindungsaktivität von IHF wurde von Bonnefoy & Rouvière-Yaniv (1991) beschrieben, die in Anwesenheit von HU eine Erhöhung der unspezifischen Bindung von IHF an DNA um den Faktor 10 beobachteten. Dieselben Autoren berichteten 1992 wie erwähnt (Bonnefoy & Rouvière-Yaniv, 1992), daß in *E. coli* HU die Bindung von IHF an den Replikationsursprung (*oriC*) in Abhängigkeit vom IHF/HU-Konzentrationsverhältnis begünstigt oder verhindert. Die in diesen Literaturbeispielen dargestellten Ergebnisse zeigen klar, daß sich HU und IHF gegenseitig hinsichtlich ihrer Bindung an DNA beeinflussen können und zum anderen, daß beide Proteine gemeinsam an derselben DNA-Region binden und wirken können. Zusammengefasst deuten die Daten somit auf eine Beteiligung von HU an der durch IHF vermittelten Aktivierung des Pu-Promotors hin, wobei IHF spezifisch und HU bzw. HupB/HupN wohl eher unspezifisch an verschiedenen Stellen zwischen der -24/-12-Region

und den XylR-Bindungssequenzen (UAS) binden. Möglicherweise wird durch die Bindung von HU in der Pu-Promotorregion die durch IHF hervorgerufene DNA-Schleife weiter verstärkt, was zu einer Verstärkung des Kontaktes zwischen XylR und der σ^{54} -RNAP führt. Der wahrscheinlichste Ort der HU-Bindung ist wohl die Region zwischen der IHF-Bindungsstelle und den UAS, denn den Bereich zwischen IHF-Bindungsstelle und -24/-12-Region ist sterisch durch die C-terminale Domäne der α -Untereinheit der RNAP (α -CTD) blockiert (Bertoni *et al.*, 1998). Abb. 4.3 stellt die mögliche Anordnung der an der Aktivierung des Pu-Promotors beteiligten Elemente zusammenfassend dar.

4.5.5 Pu wird *in vivo* wahrscheinlich von weiteren Faktoren außer IHF und HU reguliert

In Abb. 3.33 ist der Einfluß von IHF bzw. IHF + HupB/HupN auf die Pu-Promotoraktivität dargestellt. Zwar besteht eine deutliche Abhängigkeit der Pu-Aktivität von der IHF-Konzentration, jedoch wurde auch in Abwesenheit von IHF *und* HU eine signifikante Transkriptionsrate des Pu-Promotors beobachtet. D. h., die von Calb *et al.* (1996) in einem IHF⁻-Stamm von *P. putida in vivo* beobachtete, drastisch reduzierte Pu-Aktivität konnte in den *in vitro*-Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht nachvollzogen werden. In gleicher Weise konnten interessanterweise auch im heterologen *E. coli*-System die *in vitro* gemessenen Pu-Aktivitäten nicht mit den entsprechenden *in vivo*-Daten in Übereinstimmung gebracht werden: Pérez-Martín & de Lorenzo (1996a) beobachteten im *E. coli*-Transkriptionssystem, daß *in vitro* Pu auch ohne IHF eine beträchtliche Aktivität aufweist, während De Lorenzo *et al.* (1991) in einem IHF⁻-Stamm von *E. coli* nur äußerst geringe Pu-Aktivität *in vivo* fanden. D. h. sowohl in *P. putida* wie auch in *E. coli* bestehen Diskrepanzen zwischen *in vivo* und *in vitro* gemessener Pu-Aktivität. Es muß daher angenommen werden, daß sowohl in *E. coli* als auch in *P. putida* ein oder mehrere weitere Faktoren (außer IHF und HU) bei der Regulation der Aktivierung des Pu-Promotors eine Rolle spielen, d. h. hier einen negativen Effekt auf die Pu-Transkription haben. Mögliche Kandidaten wären weitere Histon-ähnliche Proteine (z. B. H-NS) oder Faktoren, die auch an der C-Quellen-abhängigen Repression von Pu (Holtel *et al.*, 1994; Cases *et al.*, 1999) oder beim „exponential silencing“ (Cases *et al.*, 1996) beteiligt sind.

4.5.6 Bei tieferen Temperaturen sinkt die Ps1-Aktivität drastisch ab

Umweltfaktoren wie z. B. Temperatur, Licht, Druck, pH-Wert und Osmolarität können einen Einfluß auf die Genexpression in Bakterien haben (Bartlett *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 1989; Lee & Kaplan, 1992; McIver *et al.*, 1995; Mikulskis *et al.*, 1994). Diese Faktoren wirken als

extrazelluläre Signale, die dann über intrazelluläre Signalvermittler-Proteine im Zellinneren regulatorische Wirkung entfalten. Sich verändernde Umgebungstemperaturen können darüber hinaus auch direkten Einfluß auf die Genexpression ausüben (Hurme & Rhen, 1998). Temperatur-abhängige Regulationseffekte sind insbesondere für den Schadstoffabbau durch Bodenbakterien wie *P. putida* von entscheidender Bedeutung, da diese Mikroorganismen an ihren natürlichen Standorten immer wechselnden Temperaturen ausgesetzt sind und so eventuell in ihrem Potential, Schadstoffe abzubauen, durch widrige Temperaturverhältnisse beeinträchtigt sind.

Mit dem *P. putida*-Transkriptionssystem wurden die Aktivierung der Promotoren Pu bzw. Ps1 jeweils bei 20 °C und im Vergleich dazu bei 37 °C gemessen (s. Abb. 3.35). Bei 20 °C war die Transkriptionsrate des Pu-Promotors um etwa 30 % niedriger als bei 37 °C. Sehr viel drastischer wirkte sich der Temperaturunterschied bei Ps1 aus. Hier sank bei 20 °C die Aktivität um ca. 85 %. Bei der Betrachtung möglicher Gründe für die unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit von Pu und Ps1 sind mindestens drei Phasen der Transkription σ^{54} -abhängiger Promotoren als mögliche Angriffspunkte temperaturabhängiger Regulationseffekte in Betracht zu ziehen: die Aktivierung, die Promotor-Clearance und die Elongation. Über die Temperaturabhängigkeit von Aktivierung und Clearance der Promotoren kann nur spekuliert werden, da nicht genug Daten über eine eventuelle Temperaturabhängigkeit der Bindung von σ^{54} -RNAP, IHF und HU an die DNA bzw. der Wechselwirkung dieser Elemente untereinander vorliegen. Für die Elongationsgeschwindigkeit dagegen wurde gezeigt, daß sie im wesentlichen von der jeweiligen DNA-Sequenz, aber eben auch von der deutlich temperaturabhängigen Reaktionsgeschwindigkeit der RNAP bestimmt wird (Hippel *et al.*, 1984). Da diese Temperaturabhängigkeit der RNAP aber für die Transkription von Pu und Ps1 in gleichem Maße gegeben ist und sich die Nukleotidsequenz natürlich nicht mit der Temperaturabnahme ändert, ist die unterschiedliche Empfindlichkeit der Promotoren Pu und Ps1 gegenüber Temperaturänderungen wohl eher über unterschiedliche Temperatureinflüsse bei der Promotor-Aktivierung oder -Clearance zu erklären.

Eine weitere mögliche Ursache der unterschiedlichen Reaktionen von Pu und Ps1 auf eine Temperaturänderung stellt die sequenzabhängige Änderung der DNA-Topologie (Superhelikalität) dar, die sich bei den beiden Promotoren bei Temperaturänderungen unterschiedlich verändern könnte. Untersuchungen vor allem bei pathogenen Bakterien haben gezeigt, daß Temperaturänderungen über Veränderungen der Superhelikalität Einfluß auf die Genexpression nehmen können (Hurme & Rhen, 1998). Neben diesen sequenzspezifischen temperaturbedingten Änderungen der DNA-Topologie, also aufgrund der spezifischen Eigenschaften der DNA selbst, kann möglicherweise auch durch temperaturabhängig variable Bindung von Histon-ähnlichen Proteinen, insbesondere von H-NS, der Grad der Superhelikalität temperaturabhängig verändert werden (Hulton *et al.*, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992). Sicher ist, daß Histon-ähnliche Proteine durch die Bindung an DNA negative Überdrehungen (Supercoils) *in vitro* (Rouvière-Yaniv *et al.*, 1979; Tupper *et al.*, 1994) und *in*

vivo (Yasuzawa *et al.*, 1992) hervorrufen.

Ein weiterer Aspekt, der bei dem beobachteten Temperatureffekt eine Rolle spielen könnte, besteht in dem Einfluß von IHF auf die Promotoraktivierung. Dieses Protein war dem Transkriptions-Assay nur bei Pu zugesetzt worden, da ja zuvor im Fall von Ps1 kein Einfluß von IHF auf die Promotoraktivität festgestellt wurde. Gerade IHF hat einen zusätzlich stimulierenden Effekt auf die Pu-Aktivierung, da es die Bindung der σ^{54} -RNAP an den Promotor verstärkt (Bertoni *et al.*, 1998), so daß möglicherweise eine ebenfalls starke Reduzierung der Promotoraktivität bei 20 °C hier durch IHF (z. B. durch bessere DNA-Bindung bei 20 °C (Giladi *et al.*, 1995)) teilweise kompensiert wird. Das HU-Protein dagegen, das dem Assay sowohl bei Pu wie bei Ps1 als HupB/HupN zugesetzt wurde, verstärkt die Bindung der σ^{54} -RNAP an Pu nicht so effektiv wie IHF (Carmona *et al.*, 1999). Ob HU bzw. HupB/HupN die Bindung der σ^{54} -RNAP auch an den Ps1-Promotor fördert, ist bisher nicht untersucht worden. Es wäre somit möglich, daß IHF bei niedrigeren Temperaturen die Bindung der σ^{54} -RNAP an den Pu-Promotor stärker fördert, als dies HU (HupB/HupN) bei Ps1 vermag, wodurch sich die höhere Aktivität von Pu bei 20 °C erklären könnte. D. h., obwohl Pu bei 20 °C eine etwas geringere Aktivität aufwies als bei 37 °C, könnte dennoch eine ähnliche Situation vorliegen, wie sie von Giladi *et al.* (1995) im Fall des P_L -Promotor des Bakteriophagen λ beobachtet wurde. Bei tieferen Temperaturen hatte IHF dort eine erhöhte Affinität zu seiner Bindungsstelle in P_L , wodurch wiederum eine erhöhte Promotoraktivität resultierte. Es ist möglich, daß IHF auch in *P. putida* doch eine erhöhte Affinität zu Pu bei 20 °C besitzt, dieser positive Effekt aber möglicherweise durch die bei 20 °C viel geringere Elongationsgeschwindigkeit der RNAP bei dieser Temperatur so überlagert wird, daß sich in der Summe der beiden Effekte immer noch eine Reduzierung der Pu-Promotoraktivität (aber „nur“ um 30 % statt um 85 % im Fall des Ps1-Promotors) ergibt. Versuche zur RNAP-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur wurden *in vitro* mit σ^{70} -RNAP aus *P. putida* von Fujita & Amemura (1992) durchgeführt. Als Template verwendeten sie Promotor-loses poly(dA-dT). Die Aktivität der σ^{70} -RNAP besaß ein Optimum bei 45 °C, während sie bei 37 ° und 20 °C nur 70 % bzw. 30 % der maximal gemessenen Aktivität betrug. Es bleibt unklar, warum das Bodenbakterium *P. putida* mit einem Wachstumsoptimum bei 25-30 °C eine RNAP mit so viel höherem Temperaturoptimum besitzt.

Der Vergleich der *in vitro*-Promotoraktivitäten von Pu und Ps1 bei 37 °C bzw. 20 °C zeigt, daß bei 37 °C Ps1 eine höhere Aktivität besaß, während bei 20 °C Pu der stärkere Promotor war. Unter der Annahme, daß die Promotoraktivität bei unterschiedlichen Temperaturen einen linearen Verlauf aufweist, kann man aufgrund der bei 20 ° und 37 °C erhaltenen Daten die zwischen diesen Temperaturen liegenden Aktivitäten ableiten (Abb. 4.4). Bei 30 °C, der optimalen Wachstumstemperatur von *P. putida*, ergibt sich damit eine annähernd gleiche *in vitro*-Aktivität für Pu und Ps1. Die in *E. coli* und *P. putida* gemessenen *in vivo*-Aktivitäten von Pu und Ps1 waren dagegen deutlich verschieden, wobei sich hier Pu

als der stärkere Promotor erwies (Pérez-Martín & de Lorenzo, 1995a; Holtel *et al.*, 1994). Darüber hinaus variieren die Aktivitäten von Pu und Ps1 unterschiedlich zwischen den Wachstumsphasen (Marqués *et al.*, 1994).

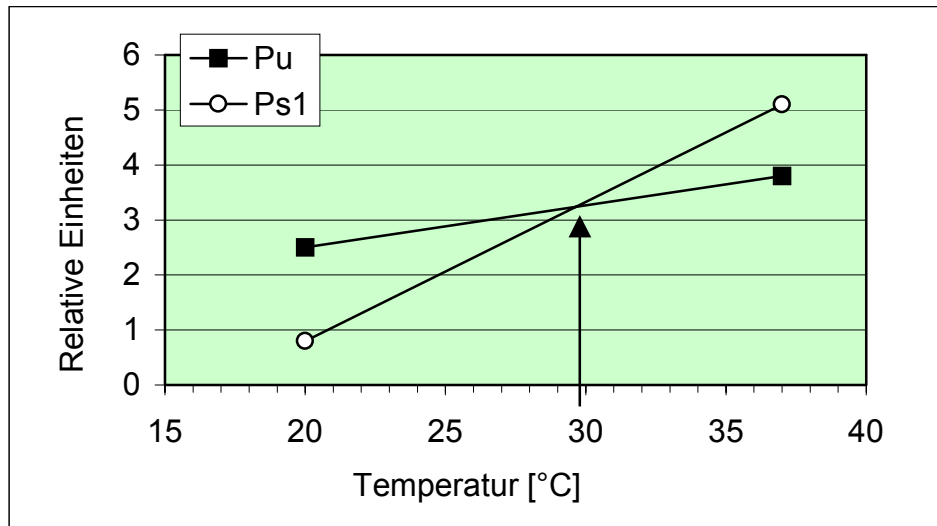


Abb. 4.4: Grafische Darstellung der Transkriptionsaktivität von Pu und Ps1 bei 37 ° und 20 °C. Daraus abgeleitet ergeben sich die Aktivitäten für die dazwischen liegenden Temperaturen.

Es stellt sich somit die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit für die Promotoren Pu und Ps1 bestimmten relativen *in vitro*-Aktivitäten bei 37 °C und 20 °C tatsächlich *in vivo* relevant sind. Hierbei wird die Temperaturabhängigkeit von Pu und Ps1 wahrscheinlich durch weitere, zum Teil noch nicht identifizierte Proteine, die an der Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren beteiligt sind, sowie durch die DNA-Topologie beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig ein ausschließlich aus Protein-komponenten von *Pseudomonas putida* bestehendes *in vitro*-Transkriptionssystem zu etablieren, mit dem spezifische Fragen zur Ko-Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Promotoren Pu und Ps1 des TOL-Plasmids durch die Histon-ähnlichen Proteine IHF und HU untersucht werden sollten. Hierzu wurden die an der Aktivierung dieser Promotoren beteiligten Proteine IHF, HU, σ^{54} und RNA-Polymerase-Core-Enzym aus *P. putida* aufgereinigt und teilweise charakterisiert. Zusammen mit bereits aufgereinigt vorliegendem Aktivator XylR $\Delta\Delta$ und der jeweiligen Promotor-DNA konnten somit alle erforderlichen Komponenten für ein reines *P. putida*-Transkriptionssystem bereitgestellt werden.

Da zu Beginn dieser Arbeit das HU-codierende Gen aus *P. putida* nicht bekannt war, waren zunächst Isolierung und Analyse dieses Gens zu leisten. Hierzu wurde ein zu *hupB* aus *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* homologes Gen kloniert. Zusammen mit einem weiteren in der Zwischenzeit von einer japanischen Arbeitsgruppe gefundenen *hupN*-Gen, das ebenfalls ein HU-Protein codiert, besitzt *P. putida* somit zwei verschiedene HU-Gene, die zu 45 % identisch sind und deren Genprodukte möglicherweise zur Bildung von heterodimerem HU befähigt sind. Während bisher angenommen worden war, daß ausschließlich Enterobakterien zwei HU-Gene bzw. heterodimeres HU aufweisen (da in den übrigen Eubakterien nur ein HU-Gen identifiziert werden konnte), scheint es nun, daß der Besitz von zwei HU-Genen ein Charakteristikum der umfassenderen Gruppe der γ -Proteobakterien sein könnte. Die funktionale Analyse der beiden HU-Gene *hupB* und *hupN* aus *P. putida* ergab, daß beide Proteine eine *Bacillus subtilis*-HU-Mutante in gleichem Maße komplementieren können, daß es aber hinsichtlich der Mitwirkung bei der Promotoraktivierung offenbar unterschiedliche Funktionalitäten für die beiden HU-Proteine gibt: so war in einer $\Delta hupB$ -Deletionsmutante von *P. putida* die Ps1-Aktivität um ca. 30 % geringer ist als im Wildtyp, während sich die Ps1-Aktivität in einer $\Delta hupN$ -Deletionsmutante von *P. putida* kaum von der im Wildtyp unterschied. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Verlust beider HU-Gene in *P. putida* letal ist, weshalb die Konstruktion einer $\Delta hupB/\Delta hupN$ -Doppeldeletionsmutante von *P. putida* nicht gelang. Zur initialen Charakterisierung und zur Verwendung in späteren *in vitro*-Transkriptionsexperimenten wurden HupB und HupN aus *P. putida* aus überexprimierenden *P. putida*-Stämmen aufgereinigt. In β -Protein-abhängigen Rekombinationstests zur Bestimmung der Aktivität von HupB und HupN zeigten sich deutliche Unterschiede: mit ansteigender HupN-Konzentration (75-200 nM) konnte eine in entsprechender Weise zunehmende Rekombinationsrate beobachtet werden, während HupB in geringer

Konzentration keine, oberhalb einer Schwellenkonzentration von 150 nM dann aber vollständige Rekombination bewirkte. Crosslinking-Experimente bewiesen weiterhin, daß sowohl HupB als auch HupN in Lösung hauptsächlich als Dimere vorliegen.

Die Aufreinigung von *P. putida*-IHF erfolgte aus überexprimierenden *E. coli*-Stämmen. Hierzu wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, das die bereits charakterisierten *P. putida*-Gene *ihfA* (in doppelter Kopienzahl) bzw. *ihfB* (in einfacher Kopienzahl) enthält, wobei beide Gene von starken Promotoren exprimiert werden und die generell geringere Expression von *ihfA* eben durch die doppelte Kopienzahl von *ihfA* ausgeglichen wird. Eine initiale Charakterisierung des gereinigten *P. putida*-IHF-Proteins zeigte, daß in *in vitro*-Rekombinationstests *P. putida*-IHF eine ähnliche Aktivität besitzt wie *E. coli*-IHF, weiterhin bemerkenswerterweise auch, daß in Gel-Retentionsexperimenten *P. putida*-IHF eine geringere Affinität zu einem Pu-Promotorfragment (aus *P. putida*) hat als IHF aus *E. coli*.

Zur Vervollständigung des Ensembles an *P. putida*-Komponenten für die Etablierung eines reinen *P. putida in vitro*-Transkriptionssystems wurde weiterhin σ^{54} -RNA-Polymerase isoliert, indem *P. putida*- σ^{54} aus einem überexprimierenden *E. coli*-Stamm und das RNA-Polymerase-Core-Enzym mit einem optimierten Protokoll nativ aus *P. putida* KT2442 aufgereinigt wurden.

Mit Hilfe der aufgereinigten *P. putida*-Proteine konnte schließlich in *in vitro*-Transkriptionstests der Einfluß der Histon-ähnlichen Proteine HupB, HupN und IHF auf die Aktivierung der *xyl*-Promotoren Pu und Ps1 separat untersucht werden. Hierbei zeigte sich, daß die Aktivität beider Promotoren durch sowohl HupB als auch HupN stimuliert werden kann, wobei sich HupN als effektiver herausstellte, da im Vergleich zu HupB schon bei geringeren Konzentrationen maximale Aktivität erreicht wurde. Da bei Ps1 mit einer Mischung aus HupB und HupN im Durchschnitt höhere Aktivitäten erreicht wurden als mit HupB oder HupN allein, deutet dies darauf hin, daß in der Zelle möglicherweise HupB/HupN-Heterodimere funktionell aktiv sind. Während die gleichzeitige Anwesenheit von HupB/HupN und IHF im Vergleich zu HupB/HupN allein bei Ps1 keinen Effekt hatte, wurden im Falle von Pu bei gleichzeitiger Anwesenheit von HupB/HupN (zusätzlich zu IHF) höhere Aktivitäten gemessen als mit IHF allein, so daß wahrscheinlich IHF und HU (HupB/HupN) bei der optimalen Aktivierung von Pu synergistisch wirken. Weiterhin wurde im *in vitro*-System die Temperaturabhängigkeit der Transkription von Pu bzw. Ps1 untersucht: Ps1 erwies sich als deutlich stärker temperaturabhängig als Pu, da die Transkriptionsrate von Ps1 im Vergleich zu Pu bei höheren Temperaturen (37 °C) größer, bei niedrigeren Temperaturen (20 °C) aber drastisch verringert war.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten *P. putida in vitro*-Transkriptionssystem können künftig spezifische regulatorische Fragestellungen gezielt angegangen werden, da alle Parameter und Komponenten bekannt sind und in kontrollierter und definierter Weise einzeln variiert werden können.

6. Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
CTP	Cytidin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
Δ	Deletion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Gramm
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	kilo-
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
m	Meter
m	milli-
μ	mikro-
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mRNA	Messenger-RNA
n	nano-
NTP	Nukleosid-Triphosphat
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
psi	pounds per square inch
R	Resistenz
RBS	Ribosomenbindestelle
RE	relative Einheiten
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Sm	Streptomycin
Tel	Tellurit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Units, internationale Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

7. Literaturverzeichnis

- Abril, M.A., Buck, M. & Ramos, J.L. (1991) Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J. Biol. Chem.*, 266, 15832-15838.
- Allan, B. & Kropinski, A.M. (1987) DNA-dependent RNA polymerase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Cell Biol.*, 65, 776-782.
- Alonso, J.C., Weise, F. & Rojo, F. (1995) The *Bacillus subtilis* histone-like protein Hbsu is required for DNA resolution and DNA inversion mediated by the β recombinase of plasmid pSM19035. *J Biol Chem*, 270, 2938-2945.
- Amann, E., Ochs, B. & Abel, K.-J. (1988) Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 69, 301-315.
- Assinder, S.J. & Williams, P.A. (1990) The TOL plasmids: determinants of the catabolism of toluene and the xylenes. *Adv. Microb. Physiol.*, 31, 1-69.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) (1994) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Azam, T.A., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. & Ishihama, A. (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol.*, 181, 6361-6370.
- Bartlett, D.H., Kato, C. & Horikoshi, K. (1995) High pressure influences on gene and protein expression. *Res. Microbiol.*, 146, 697-706.
- Bauchop, T. & Elsdén, S.R. (1960) The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, 23, 457-469.
- Benson, S. & Shapiro, J. (1978) TOL is a broad-host-range plasmid. *J. Bacteriol.*, 135, 278-280.
- Berry, A., DeVault, J.D. & Chakrabarty, A.M. (1989) High osmolarity is a signal for enhanced *algD* transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Bacteriol.*, 171, 2312-2317.
- Bertoni, G., Fujita, N., Ishihama, A. & de Lorenzo, V. (1998) Active recruitment of σ^{54} -RNA polymerase to the Pu promoter of *Pseudomonas putida*: role of IHF and α CTD. *EMBO J*, 17, 5120-5128.
- Bertoni, G., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1997) Genetic evidence of separate repressor and activator activities of the XylR regulator of the TOL plasmid, pWW0, of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.*, 23, 1221-1227.
- Bonnefoy, E., Almeida, A. & Rouvière-Yaniv, J. (1989) Lon-dependent regulation of the DNA binding protein HU in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86, 7691-7695.
- Bonnefoy, E. & Rouvière-Yaniv, J. (1991) HU and IHF, two homologous histone-like proteins of *Escherichia coli*, form different protein-DNA complexes with short DNA fragments. *EMBO J.*, 10, 687-696.

- Bonnefoy, E. & Rouvière-Yaniv, J. (1992) HU, the major histone-like protein of *E. coli*, modulates the binding of IHF to *oriC*. *EMBO J.*, 11, 4489-4496.
- Bonnefoy, E., Takahashi, M. & Yaniv, J.R. (1994) DNA-binding parameters of the HU protein of *Escherichia coli* to cruciform DNA. *J. Mol. Biol.*, 242, 116-129.
- Boubrik, F. & Rouvière-Yaniv, J. (1995) Increased sensitivity to gamma irradiation in bacteria lacking protein HU. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92, 3958-3962.
- Bouwer, E., Durant, N., Wilson, L., Zhang, W. & Cunningham, A. (1994) Degradation of xenobiotic compounds in situ: Capabilities and limits. *FEMS Microbiol. Rev.*, 15, 307-317.
- Boyer, H.W. & Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 41, 459-472.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Briat, J.F., Letoffe, S., Mache, R. & Rouvière-Yaniv, J. (1984) Similarity between the bacterial histone-like protein HU and a protein from spinach chloroplasts. *FEBS Letters*, 172, 75-79.
- Burgess, R.R. & Jendrisak, J.J. (1975) A procedure for the rapid, large scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry*, 14, 4634-4638.
- Burgess, R.R. & Travers, A.A. (1971) Purification of the RNA polymerase sigma factor. *Methods Enzymol.*, 21, 500-506.
- Calb, R., Davidovitch, A., Koby, S., Giladi, H., Goldenberg, D., Margalit, H., Holtel, A., Timmis, K., Sanchez-Romero, J.M., de Lorenzo, V. & Oppenheim, A.B. (1996) Structure and function of the *Pseudomonas putida* integration host factor. *J. Bacteriol.*, 178, 6319-6326.
- Cannon, W., Missailidis, S., Austin, S., Moore, M., Drake, A. & Buck, M. (1996) Purification and activities of the *Rhodobacter capsulatus* RpoN (σ^N) protein. *Mol. Microbiol.*, 21, 233-245.
- Carmona, M. & de Lorenzo, V. (1999) Involvement of the FtsH (HflB) protease in the activity of σ^{54} promoters. *Mol. Microbiol.*, 31, 261-270.
- Carmona, M., de Lorenzo, V. & Bertoni, G. (1999) Recruitment of RNA polymerase is a rate-limiting step for the activation of the σ^{54} promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.*, 274, 33790-33794.
- Cases, I., de Lorenzo, V. & Pérez-Martín, J. (1996) Involvement of σ^{54} in exponential silencing of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid Pu promoter. *Mol. Microbiol.*, 19, 7-17.
- Cases, I., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1999) The IIA^{Ntr} (P_{ts}N) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the σ^{54} -dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J. Biol. Chem.*, 274, 15562-15568.
- Castaing, B., Zelwer, C., Laval, J. & Boiteux, S. (1995) HU protein of *Escherichia coli* binds specifically to DNA that contains single-strand breaks or gaps. *J. Biol. Chem.*, 270, 10291-10296.
- Chakrabarty, A.M. (1976) Plasmids in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Genet.*, 10, 7-30.
- Claret, L. & Rouvière-Yaniv, J. (1996) Regulation of HU α and HU β by CRP and FIS in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 263, 126-39.
- Claret, L. & Rouvière-Yaniv, J. (1997) Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J. Mol. Biol.*, 273, 93-104.

- De Lorenzo, V., Cases, I., Herrero, M. & Timmis, K.N.** (1993) Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with *lacZ-tet* bicistronic reporters. *J. Bacteriol.*, 175, 6902-6907.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. & Timmis, K.N.** (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.*, 172, 6568-6572.
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Metzke, M. & Timmis, K.N.** (1991) An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the σ^{54} -dependent Pu promoter of TOL plasmid. *EMBO J.*, 10, 1159-1167.
- De Lorenzo, V. & Timmis, K.N.** (1994) Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.*, 235, 386-405.
- Delgado, A., Salto, R., Marqués, S. & Ramos, J.L.** (1995) Single amino acids changes in the signal receptor domain of XylR resulted in mutants that stimulate transcription in the absence of effectors. *J. Biol. Chem.*, 270, 5144-5150.
- Delic-Attree, I., Toussaint, B., Froger, A., Willison, J.C. & Vignais, P.M.** (1996) Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in *algD* gene expression. *Microbiology*, 142, 2785-2793.
- Delic-Attree, I., Toussaint, B. & Vignais, P.M.** (1995) Cloning and sequence analysis of the genes coding for the integration host factor (IHF) and HU proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 154, 61-64.
- Drlica, K. & Rouvière-Yaniv, J.** (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev.*, 51, 301-319.
- Du, Y., Holtel, A., Reizer, J. & Saier, M.H., Jr.** (1996) σ^{54} -dependent transcription of the *Pseudomonas putida* *xylS* operon is influenced by the IIA^{Ntr} protein of the phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.*, 147, 129-132.
- Duetz, W.A., Marqués, S., de Jong, C., Ramos, J.L. & van Andel, J.G.** (1994) Inducibility of the TOL catabolic pathway in *Pseudomonas putida* (pWW0) growing on succinate in continuous culture: evidence of carbon catabolite repression control. *J. Bacteriol.*, 176, 2354-2361.
- Duggleby, C.J., Bayley, S.A., Worsey, M.J., Williams, P.A. & Broda, P.** (1977) Molecular sizes and relationships of TOL plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 130, 1274-1280.
- Elliott, T. & Geiduschek, E.P.** (1984) Defining a bacteriophage T4 late promoter: absence of a "-35" region. *Cell*, 36, 211-219.
- Felsenstein, J.** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Fernandez, S., de Lorenzo, V. & Pérez-Martín, J.** (1995) Activation of the transcriptional regulator XylR of *Pseudomonas putida* by release of repression between functional domains. *Mol. Microbiol.*, 16, 205-213.
- Fernandez, S., Rojo, F. & Alonso, J.C.** (1997) The *Bacillus subtilis* chromatin-associated protein Hbsu is involved in DNA repair and recombination. *Mol. Microbiol.*, 23, 1169-1179.
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. & Timmis, K.N.** (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring *meta* cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7458-7462.
- Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A. & Tsui, P.** (1992) The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 6, 2557-2563.
- Friedman, D.I.** (1988) Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell*, 55, 545-554.

- Fujita, M. & Amemura, A.** (1992) Purification and characterization of a DNA-dependent RNA polymerase from *Pseudomonas putida*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 1797-1800.
- Furukawa, K. & Miyazaki, T.** (1986) Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *J. Bacteriol.*, 166, 392-398.
- Gallegos, M.T., Marqués, S. & Ramos, J.L.** (1996) Expression of the TOL plasmid *xylS* gene in *Pseudomonas putida* occurs from a σ^{70} -dependent promoter or from σ^{70} - and σ^{54} -dependent tandem promoters according to the compound used for growth. *J. Bacteriol.*, 178, 2356-2361.
- Gallegos, M.T., Marqués, S. & Ramos, J.L.** (1997a) The TACAN₄TGCA motif upstream from the -35 region on the σ^{70}/σ^S -dependent Pm promoter of the TOL plasmid is the minimum DNA segment required for transcription stimulation by XylS regulators. *J. Bacteriol.*, 178, 6427-6434.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K. & Ramos, J.L.** (1997b) AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 393-410.
- Giladi, H., Goldenberg, D., Koby, S. & Oppenheim, A.B.** (1995) Enhanced activity of the bacteriophage λ P_L promoter at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 2184-2188.
- Giladi, H., Igarashi, K., Ishihama, A. & Oppenheim, A.B.** (1992a) Stimulation of the phage λ pL promoter by IHF requires the carboxy terminus of the α -subunit of RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 227, 985-990.
- Giladi, H., Wang, W.X. & Oppenheim, A.B.** (1992b) Isolation and characterization of the *hupA* gene coding for HU of *Aeromonas proteolytica*. *Nucleic Acids Res.*, 20, 4092.
- Gober, J.W. & Shapiro, L.** (1990) Integration host factor is required for the activation of developmentally regulated genes in *Caulobacter*. *Genes Dev.*, 4, 1494-1504.
- Gomada, M., Imaishi, H., Miura, K., Inouye, S., Nakazawa, T. & Nakazawa, A.** (1994) Analysis of DNA bend structure of promoter regulatory regions of xylene-metabolizing genes on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *J. Biochem. (Tokyo)*, 116, 1096-1104.
- Gomada, M., Inouye, S., Imaishi, H., Nakazawa, A. & Nakazawa, T.** (1992) Analysis of an upstream regulatory sequence required for activation of the regulatory gene *xylS* in xylene metabolism directed by the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.*, 233, 419-426.
- Goodrich, J.A., Schwartz, M.L. & McClure, W.R.** (1990) Searching for and predicting the activity of sites for DNA binding proteins: compilation and analysis of the binding sites for *Escherichia coli* integration host factor (IHF). *Nucleic Acids Res.*, 18, 4993-5000.
- Goosen, N. & van de Putte, P.** (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol. Microbiol.*, 16, 1-7.
- Gottschalk, G. & Knackmuss, H.-J.** (1993) Bakterien und der Abbau von Chemikalien: Natürliches und durch Kombination oder Konstruktion Erreichbares. *Angew. Chem.*, 105, 1437-1448.
- Gralla, J.D. & Collado-Vides, J.** (1996) Organization and function of transcription regulatory elements. In Neidhardt, F. (ed.) *Escherichia and Salmonella*. American Society of Microbiology, Washington, 1232-1246.
- Grasser, K.D., Ritt, C., Krieg, M., Fernandez, S., Alonso, J.C. & Grimm, R.** (1997) The recombinant product of the *Chryptomonas* Φ plastid gene *hlpA* is an architectural HU-like protein that promotes the assembly of complex nucleoprotein structures. *Eur. J. Biochem.*, 249, 70-6.

- Haima, P., Bron, S. & Venema, G.** (1987) The effect of restriction on shotgun cloning and plasmid stability in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.*, 209, 335-342.
- Haluzi, H., Goitein, D., Koby, S., Mendelson, I., Teff, D., Mengeritsky, G., Giladi, H. & Oppenheim, A.B.** (1991) Genes coding for integration host factor are conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 173, 6297-6299.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.
- Harayama, S., Leppik, R.A., Rekik, M., Mermod, N., Lehrbach, P.R., Reineke, W. & Timmis, K.N.** (1986) Gene order of the TOL catabolic plasmid upper pathway operon and oxidation of both toluene and benzyl alcohol by the *xylA* product. *J. Bacteriol.*, 167, 455-461.
- Harayama, S., Mermod, N., Rekik, M., Lehrbach, P.R. & Timmis, K.N.** (1987) Roles of the divergent branches of the *meta*-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates. *J. Bacteriol.*, 169, 558-564.
- Harayama, S. & Rekik, M.** (1990) The meta cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes. *Mol. Gen. Genet.*, 221, 113-120.
- Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R.A. & Timmis, K.N.** (1989) Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products. *J. Bacteriol.*, 171, 5048-5055.
- Harayama, S. & Timmis, K.N.** (1992) Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: Siegel, H. & Siegel, A. (eds.) Metal ions in biological systems, Vol. 28, Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes, 99-156, Marcel Dekker Inc., New York.
- Hawkins, A.R. & Wootton, J.C.** (1981) A single DNA-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* homologous to proteins NS1 and NS2 (HU proteins) of *Escherichia coli* and other bacteria. *FEBS Lett.*, 130, 275-278.
- Helmann, J. & Chamberlin, M.J.** (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.*, 57, 839-872.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K.N.** (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 172, 6557-6567.
- Hippel von, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. & McSwiggen, J.A.** (1984) Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 53, 389-446.
- Hofer, B. & Kühlein, B.** (1993) Site-specific mutagenesis in plasmids: a gapped circle method. *Methods Enzymol.*, 217, 173-189.
- Holtel, A., Abril, M.A., Marqués, S., Timmis, K.N. & Ramos, J.L.** (1990) Promoter-upstream activator sequences are required for expression of the *xylS* gene and upper-pathway operon on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Mol. Microbiol.*, 4, 1551-1556.
- Holtel, A., Goldenberg, D., Giladi, H., Oppenheim, A.B. & Timmis, K.N.** (1995) Involvement of IHF protein in expression of the Ps promoter of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 177, 3312-3315.
- Holtel, A., Marqués, S., Möhler, I., Jakubzik, U. & Timmis, K.N.** (1994) Carbon source-dependent inhibition of *xyl* operon expression of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 176, 1773-1776.
- Holtel, A., Timmis, K.N. & Ramos, J.L.** (1992) Upstream binding sequences of the XylR activator protein and integration host factor in the *xylS* gene promoter region of the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Nucleic Acids Res.*, 20, 1755-1762.

- Hoover, T.R., Santero, E., Porter, S. & Kustu, S. (1990) The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NifA, the transcriptional activator for nitrogen fixation. *Cell*, 63, 11-22.
- Huisman, O., Faalen, M., Girard, D., Jaffe, A., Toussaint, A. & Rouvière-Yaniv, J. (1989) Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. *J. Bacteriol.*, 171, 3704-3712.
- Hulton, C.S.J., Seirafi, A., Hinton, J.C.D., Sidebotham, J.M., Waddell, L., Pavitt, G.D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. & Higgins, C.F. (1990) Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression. *Cell*, 63, 631-642.
- Hurme, R. & Rhen, M. (1998) Temperature sensing in bacterial gene regulation - what it all boils down to. *Mol. Microbiol.*, 30, 1-6.
- Inouye, S., Yamada, M., Nakazawa, A. & Nakazawa, T. (1989) Cloning and sequence analysis of the *ntrA* (*rpoN*) gene of *Pseudomonas putida*. *Gene*, 85, 145-152.
- Ishihama, A. (1993) Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J. Bacteriol.*, 175, 2483-2489.
- Jacoby, G.A., Rogers, J.E., Jacob, A.E. & Hedges, R.W. (1978) Transposition of *Pseudomonas* toluene-degrading genes and expression in *Escherichia coli*. *Nature*, 274, 179-180.
- Janke, D. & Fritsche, W. (1985) Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *J. Basic Microbiol.*, 25, 603-619.
- Johnson, J.C., DeBacker, M. & Boezi, J.A. (1971) Deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.*, 246, 1222-1232.
- Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, 109, 137-141.
- Kano, Y., Osato, K., Wada, M. & Imamoto, F. (1987) Cloning and sequencing of the HU-2 gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 209, 408-410.
- Kano, Y., Wada, M. & Imamoto, F. (1988) Genetic characterization of the gene *hupA* encoding the HU-2 protein of *Escherichia coli*. *Gene*, 69, 331-335.
- Kano, Y., Wada, M., Nagase, T. & Imamoto, F. (1986) Genetic characterization of the gene *hupB* encoding the HU-1 protein of *Escherichia coli*. *Gene*, 45, 37-44.
- Kano, Y., Yoshino, S., Wada, M., Yokoyama, K., Nobuhara, M. & Imamoto, F. (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of the HU-1 gene of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 201, 360-362.
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M. & Schleifer, K.-H. (1996) Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *System. Appl. Microbiol.*, 19, 465-477.
- Kessler, B., de Lorenzo, V. & Timmis, K.N. (1992) A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of Gram-negative eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.*, 233, 293-301.
- Kessler, B., Timmis, K.N. & de Lorenzo, V. (1994) The organization of the Pm promoter of the TOL plasmid reflects the structure of its cognate activator protein XylS. *Mol. Gen. Genet.*, 244, 596-605.
- Knackmuss, H.-J. (1979) Halogenierte und sulfonierte Aromaten - Eine Herausforderung für Aromaten abbauende Bakterien. *Forum Mikrobiologie*, 6, 311-317.
- Knackmuss, H.-J. (1983) *Fremdstoffe in der Umwelt - Eine Herausforderung and die Biotechnologie*. J.B. Metzlersche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Köhler, T., Harayama, S., Ramos, J.L. & Timmis, K.N. (1989) Involvement of *Pseudomonas putida* RpoN sigma factor in regulation of various metabolic functions. *J. Bacteriol.*, 171, 4326-4333.

- Kohno, K., Wada, M., Kano, Y. & Imamoto, F. (1990) Promoters and autogenous control of the *Escherichia coli* *hupA* and *hupB* genes. *J. Mol. Biol.*, 213, 27-36.
- Kohno, K., Yasuzawa, K., Hirose, M., Kano, Y., Goshima, N., Tanaka, H. & Imamoto, F. (1994) Autoregulation of transcription of the *hupA* gene in *Escherichia coli*: evidence for steric hindrance of the functional promoter domains induced by HU. *J. Biochem. (Tokio)*, 115, 1113-1118.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M. & Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175-176.
- Krawiec, S. & Riley, M. (1990) Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, 54, 502-539.
- Kunz, D.A. & Chapman, P.J. (1981) Catabolism of pseudocumene and 3-ethyltoluene by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for new functions of the TOL (pWW0) plasmid. *J. Bacteriol.*, 146, 179-191.
- Kustu, S., North, A.K. & Weiss, D.S. (1991) Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 16, 397-402.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. & Weiss, D. (1989) Expression of σ^{54} (*ntxA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.*, 53, 367-376.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Le Gouill, C. & Dévy, C.V. (1991) A rapid procedure for the screening of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res.*, 19, 6655.
- Lee, J.K. & Kaplan, S. (1992) Cis-acting regulatory elements involved in oxygen and light control of *puc* operon transcription in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, 174, 1146-1157.
- Li, S. & Waters, R. (1998) *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination. *J. Bacteriol.*, 180, 3750-3756.
- Linz, D.G., Neuhauser, E.F. & Middleton, A.C. (1991) Perspectives on bioremediation in the gas industry. In Saylor, G.S., Fox, R. and Blackburn, J.W. (eds.), *Environmental biotechnology for waste treatment*. Plenum Press, New York, London, Vol. 41, 25-36.
- Maniol, C. & Beckwith, J. (1985) Tn5 *phoA*, a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8129-8133.
- Marqués, S., Gallegos, M.T., Manzanera, M., Holtel, A., Timmis, K.N. & Ramos, J.L. (1998) Activation and repression of transcription at the double tandem divergent promoters for the *xylR* and *xylS* genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, 180, 2889-2894.
- Marqués, S., Gallegos, M.T. & Ramos, J.L. (1995) Role of σ^S in transcription from the positively controlled Pm promoter of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.*, 18, 851-857.
- Marqués, S., Holtel, A., Timmis, K.N. & Ramos, J.L. (1994) Transcriptional induction kinetics from the promoters of the catabolic pathways of TOL plasmid pWW0 of *Pseudomonas putida* for metabolism of aromatics. *J. Bacteriol.*, 176, 2517-2524.
- Marqués, S., Manzanera, M., Gonzáles-Pérez, M.-M., Gallegos, M.-T. & Ramos, J.L. (1999) The XylS-dependent Pm promoter is transcribed *in vivo* by RNA polymerase with σ^{32} or σ^{38} depending on the growth phase. *Mol. Microbiol.*, 31, 1105-1113.
- Marqués, S. & Ramos, J.L. (1993) Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Mol. Microbiol.*, 9, 923-929.
- McIver, K.S., Heath, A.S. & Scott, J.R. (1995) Regulation of virulence by environmental signals in group A streptococci: influence of osmolarity, temperature, gas exchange, and iron limitation on *emm* transcription. *Infect. Immun.*, 63, 4540-4542.

- Mendelson, I., Gottesman, M. & Oppenheim, A.B.** (1991) HU and integration host factor function as auxiliary proteins in cleavage of phage lambda cohesive ends by terminase. *J. Bacteriol.*, 173, 1670-1676.
- Micka, B. & Marahiel, M.A.** (1992) The DNA-binding protein HBSu is essential for normal growth and development in *Bacillus subtilis*. *Biochimie*, 74, 641-650.
- Mikulskis, A.V., Delor, I., Thi, V.H. & Cornelis, G.R.** (1994) Regulation of the *Yersinia enterocolitica* enterotoxin Yst gene. Influence of growth phase, temperature osmolarity, pH and bacterial host factors. *Mol. Microbiol.*, 14, 905-915.
- Miller, J.H.** (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Murphy, L.D. & Zimmerman, S.B.** (1997) Isolation and characterization of spermidine nucleoids from *Escherichia coli*. *J. Struct. Biol.*, 119, 321-335.
- Nakazawa, T., Hayashi, E., Yokota, T., Ebina, Y. & Nakazawa, A.** (1978) Isolation of TOL and RP4 recombinants by integrative suppression. *J. Bacteriol.*, 134, 270-277.
- Nakazawa, T. & Yokota, T.** (1973) Benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: demonstration of two benzoate pathways. *J. Bacteriol.*, 115, 262-267.
- Nakazawa, T., Tsuda, M., Gomada, M., Inouye, S., Nakazawa, A., Kano, Y. & Imamoto, F.** (1993) Molecular cloning and characterization of HU gene from *Pseudomonas putida*. (Poster), *Pseudomonas 1993*, Fourth International Symposium on *Pseudomonas*: Biotechnology and Molecular Biology, Vancouver, Canada.
- Nash, H.A., Robertson, C.A., Flamm, E., Weisberg, R.A. & Miller, H.I.** (1987) Overproduction of *Escherichia coli* integration host factor, a protein with nonidentical subunits. *J. Bacteriol.*, 169, 4124-4127.
- North, A., Klose, K.E., Stedman, K.M. & Kustu, S.** (1993) Prokaryotic-enhancer-binding proteins reflect eucaryotic-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein NtrC. *J. Bacteriol.*, 175, 4267-4273.
- Oberto, J. & Rouvière-Yaniv, J.** (1996) *Serratia marcescens* contains a heterodimeric HU protein like *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 178, 293-297.
- Owen-Hughes, T.A., Pavitt, G.D., Santos, D.S., Sidebotham, J.M., Hulton, C.S.J., Hinton, J.C.D. & Higgins, C.F.** (1992) The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell*, 71, 255-265.
- Paci, M., Pon, C.L., Losso, M.A. & Gualerzi, C.** (1984) Proteins from the procaryotic nucleoid. High-resolution ^1H -NMR spectroscopic study of *Escherichia coli* DNA-binding proteins NS1 and NS2. *Eur. J. Biochem.*, 138, 193-200.
- Padas, P.M., Wilson, K.S. & Vorgias, C.E.** (1992) The DNA-binding protein HU from mesophilic and thermophilic Bacilli: gene cloning, overproduction and purification. *Gene*, 117, 39-44.
- Pemberton, J.M. & Fisher, P.R.** (1977) 2,4-D plasmids and persistence. *Nature*, 268, 732-733.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1995a) The σ^{54} -dependent promoter Ps of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* requires HU for transcriptional activation in vivo by XylR. *J. Bacteriol.*, 177, 3758-3763.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1995b) The amino-terminal domain of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR is a specific intramolecular repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92, 9392-9396.
- Pérez-Martín, J. & De Lorenzo, V.** (1995c) Integration host factor suppresses promiscuous activation of the σ^{54} -dependent promoter Pu of *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7277-7281.

- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1996a) *In vitro* activities of an N-terminal truncated form of XylR, a σ^{54} -dependent transcriptional activator of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.*, 258, 575-587.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1996b) ATP binding to the σ^{54} -dependent activator XylR triggers a protein multimerization cycle catalyzed by UAS DNA. *Cell*, 86, 331-339.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1996c) Identification of the repressor subdomain within the signal reception module of the prokaryotic enhancer-binding protein XylR of *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.*, 271, 7899-7902.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1996d) Physical and functional analysis of the prokaryotic enhancer of the σ^{54} -promoters of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.*, 258, 562-574.
- Pérez-Martín, J. & De Lorenzo, V.** (1997a) Coactivation *in vitro* of the σ^{54} -dependent promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* by HU and the mammalian HMG-1 protein. *J. Bacteriol.*, 179, 2757-2760.
- Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V.** (1997b) Clues and consequences of DNA bending in transcription. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 593-628.
- Pérez-Martín, J., Timmis, K.N. & de Lorenzo, V.** (1994) Co-regulation by bent DNA. Functional substitutions of the integration host factor site at σ^{54} -dependent promoter Pu of the upper-TOL operon by intrinsically curved sequences. *J. Biol. Chem.*, 269, 22657-22662.
- PGP.** (1999) <http://www.pseudomonas.com>, Pseudomonas Genome Project, unfinished Genome, letzter Zugriff: 20.03.2000.
- Pieper, D.H., Timmis, K.N. & Ramos, J.L.** (1996) Designing bacteria for the degradation of nitro- and chloroaromatic pollutants. *Naturwissenschaften*, 83, 201-213.
- Pinson, V., Takahashi, M. & Rouvière-Yaniv, J.** (1999) Differential binding of the *Escherichia coli* HU, homodimeric forms and heterodimeric form to linear, gapped and cruciform DNA. *J. Mol. Biol.*, 287, 485-497.
- Polyakov, A., Severinova, E. & Darst, S.A.** (1995) Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA-polymerase: Promotor binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell*, 83, 365-373.
- Pontiggia, A., Negri, A., Beltrame, M. & Bianchi, M.E.** (1993) Protein HU binds specifically to kinked DNA. *Mol. Microbiol.*, 7, 343-350.
- Ramos, J.L., Marqués, S. & Timmis, K.N.** (1997) Transcriptional control of the *Pseudomonas* TOL plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 51, 341-373.
- Ramos, J.L., Mermod, N. & Timmis, K.N.** (1987) Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta*-cleavage pathway for degradation of alkylbenzoates by *Pseudomonas*. *Mol. Microbiol.*, 1, 293-300.
- Ramos-Díaz, M.A. & Ramos, J.L.** (1998) Combined physical and genetic map of the *Pseudomonas putida* KT2440 chromosome. *J. Bacteriol.*, 180, 6352-6363.
- Reineke, W. & Knackmuss, H.-J.** (1979) Construction of haloaromatics utilising bacteria. *Nature*, 277, 385-386.
- Reitzer, L.J. & Magasanik, B.** (1986) Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell*, 45, 785-792.
- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K. & Nash, H.A.** (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: A protein-induced DNA U-turn. *Cell*, 87, 1295-1306.
- Rojo, F. & Alonso, J.C.** (1994) A novel site-specific recombinase encoded by the *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035. *J. Mol. Biol.*, 238, 159-172.

- Rouvière-Yaniv, J. & Kjeldgaard, N.O. (1979) Native *Escherichia coli* HU protein is a heterotypic dimer. *FEBS Letters*, 106, 297-300.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M. & Germond, J. (1979) *Escherichia coli* DNA-binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. *Cell*, 17, 265-274.
- Salto, R., Delgado, A., Gallegos, M.-T., Manzanera, M., Marqués, S. & Ramos, J.L. (1996) Fine control of expression of the catabolic pathways of TOL plasmid of *Pseudomonas putida* for mineralization of aromatic hydrocarbons. In Nakazawa, T., Furukawa, K., Haas, D. and Silver, S. (eds.), *Molecular Biology of Pseudomonads*. American Society for Microbiology, Washington, pp. 207-216.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sanchez-Romero, J.M., Diaz-Orejas, R. & de Lorenzo, V. (1998) Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulations of *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 4040-4046.
- Sandman, K., Pereira, S.L. & Reeve, J.N. (1998) Diversity of prokaryotic chromosomal proteins and the origin of the nucleosome. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54, 1350-1364.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166, 368-379.
- Schlegel, H.G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, New York.
- Schmid, M.B. (1990) More than just "Histone-like" proteins. *Cell*, 63, 451-453.
- Shingler, V., Powiowski, J. & Marklund, U. (1992) Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. CF600. *J. Bacteriol.*, 174, 711-724.
- Singleton, I. (1994) Microbial metabolism of xenobiotics: Fundamental and applied research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 59, 9-23.
- Spooner, R.A., Bagdasarian, M. & Franklin, F.C.H. (1987) Activation of the *xylDLEGF* promotor of the TOL toluene-xylene degradation pathway by overproduction of the *xylS* regulatory gene product. *J. Bacteriol.*, 169, 3581-3586.
- Stein, D.C. (1992) Plasmids with easily excisable *xylE* cassettes. *Gene*, 117, 157-158.
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.*, 219, 37-44.
- Studier, F.W. & Moffat, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, 189, 113-130.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, 185, 60-89.
- Su, W., Porter, S., Kustu, S. & Echols, H. (1990) DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial *glnA* promotor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5504-5508.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1074-1078.
- Taira, K., Hirose, J., Hayashida, S. & Furukawa K. (1992) Analysis of *bph* operon from the polychlorinated biphenyl-degrading strain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. *J. Biol. Chem.*, 267, 4844-4853.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignments aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876-4882.

- Thompson, J.F. & Landy, A.** (1988) Empirical estimation of protein induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.*, 16, 9687-9705.
- Timmis, K.N., Steffan, R.J. & Unterman, R.** (1994) Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 525-557.
- Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., Niki, H. et al.** (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . *EMBO J.*, 14, 2551-2560.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I. & Vignais, P.M.** (1993) *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 416-421.
- Tsuda, M., Minegishi, K. & Iino, T.** (1989) Toluene transposons Tn4651 and Tn4653 are class II transposons. *J. Bacteriol.*, 171, 1386-1393.
- Tupper, A.E., Owen-Hughes, T.A., Ussery, D.W., Santos, D.S., Ferguson, D.J.P., Sidebotham, J.M., Hinton, J.C.D. & Higgins, C.F.** (1994) The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. *EMBO J.*, 13, 258-268.
- Van der Meer, J.R., de Vos, W.M., Harayama, S. & Zehnder, A.J.B.** (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiol. Rev.*, 56, 677-694.
- Vis, H., Mariani, M., Vorgias, C.E., Wilson, K.S., Kaptein, R. & Boelens, R.** (1995) Solution structure of the HU protein from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Mol. Biol.*, 254, 692-703.
- Vorgias, C.E. & Wilson, K.S.** (1991) A rapid purification procedure of recombinant integration host factor from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 2, 317-320.
- Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T. & Imamoto, F.** (1988) Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 204, 581-591.
- Wang, J.T., Syed, A., Hsieh, M. & Gralla, J.D.** (1995) Converting *Escherichia coli* RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme: role of an NH₂-terminal leucine patch in σ^{54} . *Science*, 270, 992-994.
- Wellington, S.R. & Spiegelman, G.B.** (1991) Separation of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma-70 holoenzyme from core enzyme on heparin-sepharose columns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 1107-1114.
- Williams, P.A. & Murray, K.** (1974) Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for the existence of a TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 120, 416-423.
- Williams, P.A. & Sayers, J.R.** (1994) The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. *Biodegradation*, 5, 195-217.
- Williams, P.A., Shaw, L.M., Pitt, C.W. & Vrecl, M.** (1996) *XylUW*, two genes at the start of the upper pathway operon of TOL plasmid pWW0, appear to play no essential part in determining its catabolic phenotype. *Microbiology*, 143, 101-107.
- Williams, P.A. & Worsey, M.J.** (1976) Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: Evidence for the existence of new TOL plasmids. *J. Bacteriol.*, 125, 818-828.
- Worsey, M.J. & Williams, P.A.** (1975) Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.*, 124, 7-13.
- Wozniak, D.J.** (1994) Integration host factor and sequences downstream of the *Pseudomonas aeruginosa algD* transcription start site are required for expression. *J. Bacteriol.*, 176, 5068-5076.

-
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119.
- Yasuzawa, K., Hayashi, N., Goshima, N., Kohno, K., Imamoto, F. & Kano, Y.** (1992) Histone-like proteins are required for cell growth and constraint of supercoils in DNA. *Gene*, 122, 9-15.
- Yen, M. & Gunsalus, I.C.** (1982) Plasmid gene organisation: naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 874-878.
- Zylstra, G.J. & Gibson, D.T.** (1989) Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264, 14940-14946.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kenneth N. Timmis danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Abteilung Mikrobiologie (Arbeitsgruppe Biodegradation) der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) anzufertigen. Weiterhin danke ich Ihm für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Betreuung und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Víctor de Lorenzo (Centro Nacional de Biotecnología, Campus de Cantoblanco, Madrid) für die nicht nur wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung sowie für die Gelegenheit, in seinem Labor wesentliche Arbeiten meiner Promotion durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Andreas Holtel, der nicht nur diese Arbeit korrekturgelesen hat, sondern auch mich während der ganzen Zeit in verschiedenster Weise unterstützt und gezeigt hat, wie man erfolgreich Anträge schreibt.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern und LaborkollegInnen in der Arbeitsgruppe Biodegradation sowie der Abteilung Mikrobiologie der GBF für die Unterstützung und die nette Atmosphäre, in der auch Nachtschichten Spaß gemacht haben.

Allen Mitarbeitern des Labors von Víctor de Lorenzo in Madrid danke ich für die freundliche Atmosphäre und die zahlreichen Gelegenheiten, Madrid bzw. Spanien (besonders das kulinarische) kennenzulernen. Spezieller Dank gebührt Dr. Giovanni Bertoni, der mich in die Geheimnisse der Proteinaufreinigung eingeweiht hat.

Herrn Dr. E.R.B. Moore und seinem Labor danke ich für die Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung und Herrn Dr. Michael Kies für die Protein-Sequenzierung.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei meinen Eltern, ohne die diese Arbeit nie geschrieben worden wäre.

Lebenslauf

Name: Frank Bartels
Geburtsdatum/-ort: 10. März 1967 in Wolfsburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1973 – 06/1977	Grundschule Alt-Wolfsburg
08/1977 – 06/1986	Orientierungsstufe, Realschule und Gymnasium des Kooperativen Schulzentrums in Kreuzheide, Wolfsburg
06/1986	Abitur

Beruflicher Werdegang:

10/1989 – 08/1995	Biologiestudium an der Technischen Universität in Braunschweig
09/1991	Vordiplom
08/1995	Abschluß als Diplom-Biologe
04/1994 – 07/1995	Diplomarbeit bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abteilung Mikrobiologie, Braunschweig Thema: Untersuchungen zur Verbreitung, Lokalisation und Charakterisierung von Glutathion-S-Transferase-codierenden Genen in PCB-abbauenden Bakterien
01/1996 – 05/1999	Anfertigung der vorliegenden Dissertation bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abteilung Mikrobiologie, Braunschweig sowie im Centro Nacional de Biotecnología, Departamento de Biotecnología Microbiana, Madrid, Spanien

Berufstätigkeit:

09/1986 – 09/1989	Montagewerker bei der Volkswagen AG, Wolfsburg
seit 09/1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung Forschung und Entwicklung der Fresenius HemoCare Adsorber Technology GmbH, St. Wendel

Publikationen:

Mallavarapu, M., I. Möhler, M. Krüger, M.M. Hosseini, F. Bartels, K.N. Timmis & A. Holtel

(1998) Genetic requirements for the expression of benzylamine dehydrogenase activity in *Pseudomonas putida*. FEMS Microbiol. Lett. 166, 109-114.

Bartels, F., S. Backhaus, E.R.B. Moore, K.N. Timmis & B. Hofer (1999) Occurrence and

expression of glutathione-S-transferase-encoding *bphK* genes in *Burkholderia* sp. strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. Microbiology 145, 2821-2834.